

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 4 月 25 日 (25.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/32456 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 39/395,  
38/17, 31/711, 48/00, A61P 29/00, 19/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03504

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 24 日 (24.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-313459  
2000 年 10 月 13 日 (13.10.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中山保

典 (NAKAYAMA, Yasunori) [JP/JP]. 上村 孝 (KAMIMURA, Takashi) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 赤星 透 (AKAHOSHI, Tohru) [JP/JP]. 近藤啓文 (KONDO, Hirobumi) [JP/JP]; 〒228-8555 神奈川県相模原市北里1丁目15番地の1 北里大学医学部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 前田純博 (MAEDA, Sumihiro); 〒100-0011 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人株式会社 知的財産センター内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES OR PREVENTIVES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤

(57) Abstract: Remedies or preventives for rheumatoid arthritis which contain as the active ingredient a substance inhibiting LARC or a substance inhibiting LARC receptor (CCR6).

(57) 要約:

L A R C を阻害する物質、または L A R C 受容体 ( C C R 6 ) を阻害する物質を有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。



WO 02/32456 A1

## 明 細 書

慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤

## 5 技術分野

本発明は、慢性関節リウマチの治療剤または予防剤に関するものである。さらに詳しくは、L A R Cを阻害する物質またはL A R C受容体を阻害する物質を有効成分とする、慢性関節リウマチの治療剤または予防剤に関するものである。

10

## 背景技術

慢性関節リウマチ ( r h e u m a t o i d a r t h r i t i s ) は原因不明の多関節炎を主な特徴とする全身性慢性炎症疾患で、免疫異常を伴う自己免疫疾患である。すなわち、慢性関節リウマチ患者の関節では、リンパ球をはじめとする白血球の著明な浸潤、滑膜細胞の異常な増殖による多層構造の形成 ( p a n n u s 形成 ) などが観察される。慢性関節リウマチの発症の機序として、これまで遺伝、細菌感染あるいは各種のサイトカインやケモカインの関与が報告されているが、いまだその発症のメカニズムは不明である ( F e l d m a n n ら , C e l l , 1 9 9 6 , 8 5 , 3 0 7 ) 。

最近では、慢性関節リウマチ患者の滑膜および滑液内への白血球の浸潤には、関節内でのケモカインの発現が必要であることが発見され、これまでにインターロイキン-8、r e g u l a t e d u p o n a c t i v a t i o n n o r m a l T c e l l e x p r e s s e d a n d s e c r e t e d ( R A N

TES)、macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)などのケモカインが関与することが明らかとなっている。

- 5 実際、これらのケモカインとその受容体の結合を阻害することによって、慢性関節リウマチのモデル動物において症状が軽減されることが報告されている (Barnesら, J. Clin. Invest., 1998, 101, 2910; Ogataら, J. Pathol., 1997, 182, 106)。しかし、これら
- 10 のケモカインを阻害することで完全に症状が改善されるわけではない。さらに、これらのケモカイン以外にも関節部位での異常免疫応答に関与している新たなケモカインが存在していると考えられている。

- ケモカインとは、約10 kDの分子量をもち、様々な細胞により
- 15 り産生される一群の炎症/免疫制御ポリペプチドの総称である。ケモカインはN末端の4つのシステインのうち最初の2つのシステインの並び方によりサブグループに分けられる。すなわち、N末端側の2つのシステインが連続しているCCケモカインと、間に1つのアミノ酸が挿入されたCXCケモカインが代表的なサブ
- 20 グループである。また、この他に、Cケモカイン、CX3Cケモカインも報告されている (Murdochら, Blood, 2000, 95, 3032; Rossiら, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18, 217)。

- これらのケモカインは、7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体
- 25 であるケモカイン受容体と結合する。またケモカインは、細胞遊走を促進し、細胞接着分子の発現増強作用、さらには細胞接着増

強作用を有しているので、炎症組織などの病変部位に対する白血球などの接着・浸潤に密接な関連を持つタンパク性因子であると考えられている (Murdochら, Blood, 2000, 95, 3032; Rossiら, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18, 217; Campbellら, Science, 1998, 279, 381)。

慢性関節リウマチ患者の関節滑膜には、マクロファージの他に、樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球等の浸潤も観察され、関節局所における異常免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、これらの細胞の浸潤を特異的に誘導するケモカインについては、慢性関節リウマチにおいて必ずしも明らかにされていない。

これまで、慢性関節リウマチは、Tリンパ球、マクロファージ、滑膜細胞を中心とした免疫異常が原因であると考えられてきた。しかしながら、慢性関節リウマチ患者の約80%において、血清中にBリンパ球が産生する自己抗体であるリウマトイド因子が検出されること、慢性関節リウマチ患者の関節滑膜内にBリンパ球の浸潤が見られ、実際にこの浸潤Bリンパ球がリウマトイド因子を産生すること、などが証明され、慢性関節リウマチの病態形成におけるBリンパ球の重要性が注目され始めている (Reparon-Schuijtら, Arthritis. Rheum., 1998, 41, 2211; Kimら, J. Immunol., 1999, 162, 3053; Williamsら, Immunology, 1999, 98, 123)。

また、慢性関節リウマチの発症に樹状細胞が関与していることを示す知見も報告されている。すなわち、慢性関節リウマチ患者

の滑膜には、Tリンパ球の豊富な領域に樹状細胞が存在しており、これらの樹状細胞がTリンパ球へ抗原を提示し、活性化させていると考えられる。一方、健常人および変形性関節症患者の滑膜組織に存在している樹状細胞はごくわずかで、Tリンパ球も活性化  
5 されていない。したがって、慢性関節リウマチ患者滑膜内の樹状細胞が、関節局所における異常免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられる（佐藤和人，医学のあゆみ，1997，182，534）。

さらに、慢性関節リウマチ患者の滑膜において、最初に浸潤してくる細胞は未熟な樹状細胞であることが知られている。すなわち、これらの浸潤した未熟な樹状細胞が滑膜内で成熟樹状細胞に分化し、自己抗原を提示することによって病因Tリンパ球を活性化させている。この後、これらの病因Tリンパ球がマクロファージ、Bリンパ球を活性化させることから、滑膜への樹状細胞の浸  
10 潤を阻害することによって、Tリンパ球、マクロファージ、Bリンパ球の活性化を抑制できると考えられる（Thomasら，Immunol. Today，1996，17，559；Thomasら，Arthritis. Rheum.，1992，35，1455）。

20 また、慢性関節リウマチ患者の滑膜内へ浸潤したTリンパ球の大部分は、メモリーTリンパ球であることが知られている。したがって、慢性関節リウマチの病因となるTリンパ球は、このメモリータイプのTリンパ球である可能性が高い（Thomasら，Arthritis. Rheum.，1992，35，145  
25 5）。

すなわち、慢性関節リウマチ患者の関節滑膜内への樹状細胞、

Bリンパ球、メモリーTリンパ球の浸潤を阻害することが、慢性関節リウマチの新たな治療法につながると考えられる。さらに、滑膜における樹状細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害することは、初期の慢性関節リウマチの治療もしくは慢性関節リウマチの予防につながると考えられる。

しかしながら、なぜこれらの細胞が、健常人および変形性関節症患者の滑膜組織ではなく、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織だけに浸潤するのか原因は明らかになっておらず、さらには、これらの細胞浸潤を特異的に阻害する薬剤は知られていない。

10 本発明の目的は、慢性関節リウマチ患者の発症関節における樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球の浸潤、分化、活性化を防ぐことによる治療剤もしくは予防剤を提供することにある。

さらに本発明の目的は、LAR Cを阻害する物質もしくはLAR Cの受容体を阻害する物質を有効成分とし、慢性関節リウマチ  
15 の発症関節における樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球の浸潤、分化、活性化を防ぐことによる治療剤もしくは予防剤を提供することにある。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞が、未熟樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球の細胞遊走を誘導するケモカインであるLAR Cを産生すること、および慢性関節リウマチ患者の滑膜においてLAR Cとその受容体であるCCR 6の発現が観察されることを発見し、さらには、LAR CとLAR C受容体の結合阻害が、慢性関節リウマチの治療薬もしくは予防薬となりえることを知見して、本発明を  
20 完成するに至った。

## 発明の開示

すなわち本発明は、L A R C を阻害する物質または L A R C 受容体を阻害する物質を有効成分とする、慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤を提供するものである。

5

## 図面の簡単な説明

図 1 は慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞における L A R C メッセンジャー R N A ( m R N A ) の発現を R T - P C R 法およびサザンハイブリダイゼーション法により調べたものである。

10 図 2 は慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞における L A R C タンパク質の発現を免疫染色法により調べたものである。

図 3 は慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清により誘導されたリンパ球遊走に対する抗 L A R C 抗体の阻害効果を調べたものである。

15 図 4 は慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清により誘導された末梢血単核球に対する抗 L A R C 抗体の阻害効果を調べたものである。

図 5 は慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清により誘導された末梢血単核球に対する抗 C C R 6 抗体の阻害効果を調べたものである。

20 図 6 は慢性関節リウマチ患者および変形性関節症患者の滑膜組織における L A R C タンパク質の発現を免疫染色法により調べたものである。

図 7 は慢性関節リウマチ患者の滑膜組織における L A R C m R N A の発現を I n s i t u h y b r i d i z a t i o n 法により調べた結果である。

25

図 8 は慢性関節リウマチ患者の滑膜組織における C C R 6 陽性細胞の浸潤を免疫染色法により調べたものである。

図 9 は慢性関節リウマチ患者の滑膜組織における C C R 6 m R N A の発現を I n s i t u h y b r i d i z a t i o n 法  
5 により調べた結果である。

図 1 0 はマウス I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節における L A R C m R N A の発現をリアルタイム P C R 法により経時的に調べたものである。

図 1 1 はマウス I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節にお  
10 ける C C R 6 m R N A の発現をリアルタイム P C R 法により経時的に調べたものである。

図 1 2 はマウス I I 型コラーゲン関節炎モデルの滑膜組織における樹状細胞の浸潤を免疫染色法により調べたものである。

図 1 3 はラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節にお  
15 ける L A R C m R N A の発現を R T - P C R 法により経時的に調べたものである。

図 1 4 はラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節における C C R 6 と考えられる、m R N A の発現を R T - P C R 法により経時的に調べたものである。

図 1 5 はラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの滑膜組織にお  
20 ける L A R C タンパク質の発現を免疫染色法により調べたものである。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤とは、慢性関節リウマチ患者に投与することにより、症状の緩和、治療もし

くは予防効果を有する薬剤である。

L A R C とは、最近新たに発見された C C ケモカインの一つである。L A R C は、主に肝臓、肺、腸管組織、リンパ節、扁桃、皮膚組織で発現が見られ、未熟樹状細胞、樹状細胞の前駆細胞、

5 B リンパ球、メモリー T リンパ球の遊走を誘導する能力を持つ。L A R C の発現は、脾臓以外の二次リンパ組織などで恒常的に観察されるものと、炎症性の刺激により一過性に誘導されるものの二種類に分けられる。したがって、L A R C には恒常性を維持する働きと炎症組織へ細胞を遊走させる働きがあると考えられる

10 (H i e s h i m a ら, J . B i o l . C h e m . , 1 9 9 7 , 2 7 2 , 5 8 4 6 ; R o s s i ら, J . I m m u n o l . , 1 9 9 7 , 1 5 8 , 1 0 3 3 ; H r o m a s ら, B l o o d , 1 9 9 7 , 8 9 , 3 3 1 5 ; P o w e r ら, J . E x p . M e d . , 1 9 9 7 , 1 8 6 , 8 2 5 ; C o o k ら, I m m u n i t y , 2 0 15 0 0 , 1 2 , 4 9 5 ) 。

L A R C に対する細胞遊走は、L A R C 受容体を介して起こる。

L A R C 受容体としては、ケモカイン受容体 C C R 6 が知られており、未熟樹状細胞、樹状細胞の前駆細胞、B リンパ球、メモリー T リンパ球には C C R 6 が発現している (B a b a ら, J . B i o l . C h e m . , 1 9 9 7 , 2 7 2 , 1 4 8 9 3 ; G r e a v e s ら, J . E x p . M e d . , 1 9 9 7 , 1 8 6 , 8 3 7 ; D i e u ら, J . E x p . M e d . , 1 9 9 8 , 1 8 8 , 3 7 3 ; L i a o ら, J . I m m u n o l . , 1 9 9 9 , 1 6 2 , 1 8 6 ; B o w m a n ら, J . E x p . M e d . , 2 0 0 0 , 1 9 20 1 , 1 3 0 3 ) 。

一般的に、ケモカインとその受容体は、1 対 1 で対応している

わけではなく、ひとつのケモカインが複数のケモカイン受容体に結合することが知られている。反対に、ひとつのケモカイン受容体に複数のケモカインが結合することも報告されている。したがって、L A R C に対する受容体は、C C R 6 以外にも存在している  
5 と考えられる (M u r d o c h ら, B l o o d, 2 0 0 0, 9 5, 3 0 3 2)。

慢性関節リウマチ患者の滑膜において、最初に浸潤が確認される細胞は未熟樹状細胞であることが報告されている。これらの浸潤した未熟な樹状細胞が滑膜内で成熟樹状細胞に分化し、自己抗原を提示することによって病因 T リンパ球の活性化を誘導する。  
10 この後、これらの病因 T リンパ球がマクロファージ、B リンパ球を活性化する。一方、健常人および変形性関節症患者の滑膜組織において、存在している樹状細胞はごくわずかで、T リンパ球も活性化されていない (佐藤和人, 医学のあゆみ, 1 9 9 7, 1 8  
15 2, 5 3 4)。

すなわち、樹状細胞は T リンパ球の活性化において最も重要な抗原提示細胞であるため、滑膜への樹状細胞の浸潤を阻害することによって、T リンパ球の活性化を抑制し、さらには、マクロファージ、B リンパ球の活性化を抑制できると考えられる (T h o  
20 m a s ら, I m m u n o l. T o d a y, 1 9 9 6, 1 7, 5 5 9 ; 上阪等, M e b i o, 1 9 9 5, 1 1 月号, 4 4 ; T h o m a s ら, A r t h r i t i s. R h e u m., 1 9 9 2, 3 5, 1 4 5 5)。

したがって、本発明の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤は、慢性関節リウマチの発症関節における樹状細胞の浸潤、分化、活性化を防ぐ作用を保持することが期待されることから、初  
25

期の慢性関節リウマチの治療もしくは慢性関節リウマチの予防に使用できる。

また、慢性関節リウマチ患者の滑膜において、Bリンパ球は慢性関節リウマチ炎症の比較的后期にBリンパ球の活性化の場である濾胞を形成し、自己抗体であるリウマトイド因子を産生する  
(Reparon-Schuijter, Arthritis. Rheum., 1998, 41, 2211; Kimら, J. Immunol., 1999, 162, 3053; Williamsら, Immunology, 1999, 98, 123)。近年、リウ  
マトイド因子は慢性関節リウマチの病態の慢性化に関わっている  
ことが示唆されている。したがって、本発明の慢性関節リウマチ  
の治療剤もしくは予防剤は、慢性関節リウマチの発症関節におけ  
るBリンパ球の浸潤、分化、活性化を防ぐ作用を保持することが  
期待されることから、慢性化した慢性関節リウマチの治療および  
病状の進展防止に使用できる(上阪等, Mebio, 1995, 11月号, 44)。

本発明で使用する「LARCを阻害する物質」とは、LARCの生物学的活性を阻害する物質を意味し、例えばLARCによって惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質、  
LARCのRNAもしくはタンパク質の発現を抑制する物質などを挙げることができる。中でも、LARCによって惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質が好ましく、より好ましくはLARCにより誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価することにより得られた物質等を挙げることができる。

上記の「LARCにより誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価することにより得られた物質」は、市販されているLARC

タンパク質、もしくは細菌、酵母、哺乳類由来の細胞、昆虫由来の細胞において強制的に発現させたL A R Cタンパク質により誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価して得ることができる。

これらの「L A R Cタンパク質」はL A R Cの生物学的活性を保持する物質であれば、その種類および由来を問わず、哺乳類の体内から精製されたL A R Cタンパク質、培養細胞内およびその培養上清中のL A R Cタンパク質であってもよい。なかでも、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清中に存在するL A R Cタンパク質が好ましいが、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清中に含まれるものであれば、目的タンパク質がL A R Cと限られるものではない。

本発明で使用する「L A R Cにより誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価することにより得られた物質」は、抗L A R C抗体のL A R C阻害作用と比較し評価することにより得られた物質が望ましい。具体的には、実施例3および4で示したようにL A R Cを阻害する抗体を用いて細胞遊走に対する阻害能を評価することが望ましいが、L A R Cの生物学的活性に対する阻害能を評価して得られた物質であれば、その種類および由来を問わない。

例えば、L A R Cによる細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇やL A R Cによる細胞接着を阻害し評価することによって得ることができる。

本発明で使用する「L A R Cを阻害する物質」は、L A R Cによるシグナル伝達を遮断しL A R Cの生物学的活性を抑制する

「L A R Cのアンタゴニスト（拮抗物質）」を含む。

これらの「L A R Cを阻害する物質」はL A R Cの生物学的活性を阻害する物質であれば、その種類および由来を問わず、例え

ば、低分子化合物、L A R C に対する中和抗体、L A R C 遺伝子の一部に対するアンチセンス D N A、等を挙げることができ、好ましくは低分子化合物、中和抗体を挙げることができる。なかでも抗 L A R C 抗体が好ましい。

- 5     該抗 L A R C 抗体は、実施例 3 および 4 で示したように L A R C に対する細胞遊走を阻害する抗体を用いることが望ましいが、L A R C の生物学的活性を阻害する抗体であれば、その種類（モノクローナル、ポリクローナル）および由来を問わない。好ましくは、哺乳動物由来のモノクローナル抗体を挙げることができる
- 10    が、本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものであってよい。

該抗 L A R C 抗体は、例えば次の方法で得ることができる。

- 15    すなわち、推定される L A R C のアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドや、L A R C を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、哺乳類由来の細胞、昆虫由来の細胞、などにより産生された L A R C タンパク質を通常のタンパク化学的方法で精製し、これらを免疫原として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物を免疫し、その血清
- 20    由来の抗体（ポリクローナル抗体）を作成する方法である。

あるいは次の方法によっても得ることができる。

- すなわち、免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節からリンパ球を取り出し、ミエローマ細胞と融合させて K o h l e r
- 25    と M i l s t e i n の方法（K o h l e r ら，N a t u r e，1975，256，495）またはその改良法である U e d a らの

方法（Uedaら，Proc. Natl. Acad. Sci. U S A，1982，79，4386）に従ってハイブリドーマを作製した後、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を産生させ得る方法である。

- 5 具体的には例えば以下の工程により抗LARCモノクローナル抗体を得ることができる。

- (A) LARCタンパク質によるマウスの免疫、
- (B) 免疫マウスの脾臓の摘出および脾臓細胞の分離、
- (C) 分離された脾臓細胞とマウスミエローマ細胞との融合促進
- 10 剤（例えばポリエチレングリコール）の存在下での上記Kohlerらに記載の方法による融合、
- (D) 未融合ミエローマ細胞が成長しない選択培地で得られたハイブリドーマ細胞の培養、
- (E) 酵素結合免疫吸着検定（ELISA）、ウェスタンブロッ
- 15 ト等の方法による所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択および限定希釈法等によるクローニング、
- (F) 抗LARCモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を培養し、モノクローナル抗体を収穫する。

- また、本発明に使用される抗体はヒトLARCの生物学的活性
- 20 を中和する能力があれば市販されている抗体であってもよい。例えば、ウサギIgG抗ヒトLARCポリクローナル抗体（Pepro Tech製）等を挙げることができる。

- 本発明で使用する「LARC受容体を阻害する物質」とは、LARC受容体の生物学的活性を阻害する物質を意味し、例えばL
- 25 ARC受容体を介して惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質、LARC受容体のRNAもしくはタンパク

- 質の発現を抑制する物質等を挙げることができる。中でも、L A R C 受容体を介して惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質が好ましく、より好ましくはL A R C 受容体を介した細胞遊走に対する阻害能を評価することにより見出された
- 5 L A R C 受容体阻害物質を挙げることができる。本発明のL A R C 受容体としては、ケモカイン受容体C C R 6を好ましいものとして挙げることができるが、L A R C に対する結合力を有し、この結合により、細胞が遊走、分化、あるいは活性化するものであれば、その種類および由来を問わない。
- 10 本発明で使用する「抗L A R C 受容体抗体のL A R C 受容体阻害作用と比較し評価することにより得られた物質」は、実施例5で示したようにL A R C 受容体を阻害する抗体を用いて細胞遊走に対する阻害能を評価することが望ましいが、L A R C 受容体の生物学的活性に対する阻害能を評価して得られた物質であれば、
- 15 その種類および由来を問わない。例えば、L A R C 受容体を介した細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇やL A R C 受容体を介した細胞接着を阻害し評価することによって得ることができる。

- 本発明の抗L A R C 受容体抗体としては、抗C C R 6抗体を好
- 20 ましいものとして挙げることができるが、L A R C に対する結合力を有し、この結合により、細胞の遊走、分化、あるいは活性化を介する受容体に対する抗体であれば、その種類および由来を問わない。

- さらに、本発明で使用する「L A R C 受容体を阻害する物質」
- 25 は、L A R C 受容体を介したシグナル伝達を遮断しL A R C 受容体の生物学的活性を抑制する「L A R C 受容体のアンタゴニスト

（拮抗物質）」を含む。

これらの「L A R C受容体を阻害する物質」はL A R C受容体の生物学的活性を阻害する物質であれば、その種類および由来を問わず、例えば、低分子化合物、L A R C受容体に対する中和抗体、L A R C受容体遺伝子の一部に対するアンチセンスDNAなどを挙げることができ、好ましくは低分子化合物、中和抗体を挙げる  
5 ことができる。なかでも抗L A R C受容体抗体が好ましい。

該抗L A R C受容体抗体は、L A R C受容体を介した細胞遊走を阻害する抗体を用いることが望ましいが、L A R C受容体の生物学的活性を阻害する抗体であれば、その種類（モノクローナル、ポリクローナル）および由来を問わない。好ましくは、哺乳動物由来のモノクローナル抗体を挙げる  
10 ことができるが、本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものであ  
15 てよい。

また、該抗L A R C受容体抗体は、例えば以下の方法で得ることができる。

すなわち、推定されるL A R C受容体のアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドや、L A R C受容体を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、哺乳  
20 類由来の細胞、昆虫由来の細胞等により産生されたL A R C受容体タンパク質を通常のタンパク化学的方法で精製し、これらを免疫原として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等の動物を免  
25 疫し、その血清由来の抗体（ポリクローナル抗体）を作成する方法である。

あるいは以下の方法によっても得ることができる。

すなわち、免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節からリンパ球を取り出し、ミエローマ細胞と融合させてK o h l e r とM i l s t e i nの方法（K o h l e rら, N a t u r e, 1 9 7 5, 2 5 6, 4 9 5）またはその改良法であるU e d aらの方法（U e d aら, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 1 9 8 2, 7 9, 4 3 8 6）に従ってハイブリドーマを作製した後、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を産生させ得る。

10 具体的には例えば以下の工程により抗L A R C受容体モノクローナル抗体を得ることができる。

- (A) L A R C受容体タンパク質によるマウスの免疫、
- (B) 免疫マウスの脾臓の摘出および脾臓細胞の分離、
- (C) 分離された脾臓細胞とマウスミエローマ細胞との融合促進
- 15 剤（例えばポリエチレングリコール）の存在下での上記K o h l e rらに記載の方法による融合、
- (D) 未融合ミエローマ細胞が成長しない選択培地で得られたハイブリドーマ細胞の培養、
- (E) 酵素結合免疫吸着検定（E L I S A）、ウェスタンブロット
- 20 ト等の方法による所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選択および限定希釈法等によるクローニング、
- (F) 抗L A R C受容体モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を培養し、モノクローナル抗体を収穫する。

また、本発明に使用される抗体はヒトL A R C受容体の生物学

25 的活性を中和する能力があれば市販されている抗体であってもよい。例えば、マウスI g G 2 b抗ヒトC C R 6モノクローナル抗

体 (R & D S y s t e m s 製)等を挙げることができる。

さらには、市販されている L A R C タンパク質、もしくは細菌、酵母、哺乳類由来の細胞、昆虫由来の細胞において強制的に発現させた L A R C タンパク質により誘導された細胞遊走に対する阻  
5 害能を評価することにより慢性関節リウマチの治療剤や予防剤のスクリーニングを行うことができる。用いる L A R C タンパク質は L A R C の生物学的活性を保持する物質であれば、その種類および由来を問わず、哺乳類の体内から精製された L A R C タンパク質、培養細胞内およびその培養上清中の L A R C タンパク質で  
10 あってもよい。なかでも、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の培養上清中の L A R C タンパク質が好ましいが、目的タンパク質が L A R C とは限られるものではない。さらに好ましくは、該抗 L A R C 抗体の L A R C 阻害作用、もしくは、該抗 L A R C 受容体抗体の L A R C 受容体阻害作用と比較し評価することによっ  
15 て、慢性関節リウマチの治療剤や予防剤のスクリーニングをする方法が挙げられるが、細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇阻害や細胞接着阻害を評価方法として使用できる。

該スクリーニング法は、低分子化合物、抗体のスクリーニングに使用することが好ましいが、これらに限られたものではない。  
20 また、該スクリーニング法に用いる細胞は、L A R C 受容体を発現していれば、その発現量、種類および由来を問わない。好ましくは、遺伝子工学的に C C R 6 を含む L A R C 受容体を強制的に発現させた細胞、B リンパ球、メモリー T リンパ球、未熟樹状細胞、樹状細胞の前駆細胞が挙げられる。

25 本発明で使用する「L A R C ポリペプチドを一部変異させた物質」は、L A R C 受容体に対して結合力を持つが、L A R C タン

パク質が本来保持する生物学的活性を持たない物質を含む。好ましくは、物理的、化学的、薬学的にLARCタンパク質を修飾、欠損、断片化した物質等が挙げられるが、その種類および由来を問わない。好ましくは、LARCのシグナル伝達に重要であると  
5 考えられるN末端領域を修飾、欠損させた物質であり、さらに好ましくはN末端側からCCケモカインの間で保存された2つのシステインまでの領域を修飾、欠損させた物質である。

本発明で使用する「LARC遺伝子を遺伝子工学的に改変し得られた物質」は、遺伝子工学的にLARC遺伝子を修飾、欠損、  
10 変異させ、この遺伝子改変を基に合成されたLARCタンパク質変異体を含む。この遺伝子改変を基に合成されたLARCタンパク質変異体は、LARC受容体に対して結合力を持つが、LARCタンパク質が本来保持する生物学的活性を持たない物質であることが好ましい。好ましくは、LARCのシグナル伝達に重要で  
15 ありと考えられるN末端領域を修飾、欠損させた物質であり、さらに好ましくはN末端側からCCケモカインの間で保存された2つのシステインまでの領域を修飾、欠損させた物質である。さらに具体的には、LARCの生物種間でより保存された部位を遺伝子工学的に改変することが望ましいが、その種類および由来を問  
20 わない。

一般的に慢性関節リウマチモデル動物は、臨床試験での評価を前提とした慢性関節リウマチの予防剤あるいは治療剤のスクリーニング方法として重要な役割を果たしている。本発明で使用する  
「慢性関節リウマチモデル動物」としては、マウスII型コラー  
25 ゲン関節炎モデル（マウスCIA）もしくはラットII型コラーゲン関節炎モデル（ラットCIA）が好ましいが、慢性関節リウ

マチモデル動物として用いられるものであれば、その種類および由来を問わない。例えば、ラットアジュバント関節炎モデル、ウサギ関節炎モデル、MRLマウスモデル、抗II型コラーゲン抗体投与モデル、TNF- $\alpha$ トランスジェニック動物モデル、  
5 severe combined immunodeficiency (SCID) マウスモデル、サル関節炎モデル等が挙げられる。後述の実施例10～15に示したように、本発明においては、代表的な慢性関節リウマチモデル動物において、慢性関節リウマチ患者の関節滑膜と同じく、LARCならびにCCR6およびそれらに関連する細胞が病態と関連することを明確に示した。したがって、慢性関節リウマチの治療剤あるいは予防剤の取得を目的としたLARCを阻害する物質、LARC受容体を阻害する物質、LARCのアンタゴニスト、またはLARC受容体のアンタゴニストをスクリーニングする方法に「慢性関節リウマチモデル動物」  
10  
15

本発明で使用する「慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られたLARCを阻害する物質」とは、哺乳類のLARCの生物学的活性を阻害する物質を意味し、例えばLARCによって惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質、LARCのRNAもしくはタンパク質の発現を抑制する物質などを挙げることができる。中でも、慢性関節リウマチモデル動物の滑膜内への細胞浸潤を抑制するものが好ましいが、  
20  
25

- 1) 血中のII型コラーゲンに対する抗体量、
- 2) 足浮腫、足体積、
- 3) 骨、軟骨破壊、
- 4) 足、尾、鼻等の炎症反応、

- 5 ) 血沈、
- 6 ) 末梢血中の白血球数増加、
- 7 ) 臓器重量変化、
- 8 ) フィブリノーゲン、C - r e a c t i v e   p r o t e i n
- 5   ( C R P ) 等の血中急性期反応タンパク質、
- 9 ) D N A に対する抗体等の自己抗体価、
- 1 0 ) 生存率、
- 1 1 ) 滑膜増生、

等を改善するものであれば、その種類および由来を問わない。さ  
10 らに好ましくは、抗 L A R C 抗体が挙げられる。

さらに、本発明で使用する「慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られた L A R C を阻害する物質」は、L A R C によるシグナル伝達を遮断し L A R C の生物学的活性を抑制する「L A R C のアンタゴニスト（拮抗物質）」を含む。

- 15    本発明で使用する「慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られた L A R C 受容体を阻害する物質」とは、哺乳類の L A R C 受容体の生物学的活性を阻害する物質を意味し、例えば L A R C 受容体を介して惹起される細胞の遊走、分化、あるいは活性化を阻害する物質、L A R C 受容体の R N A もしくは
- 20    タンパク質の発現を抑制する物質などを挙げることができる。L A R C 受容体としては、ケモカイン受容体 C C R 6 を好ましいものとして挙げることができるが、L A R C に対する結合力を有し、この結合により、細胞が遊走、分化、あるいは活性化するものであれば、その種類および由来を問わない。

- 25    該「慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られた L A R C 受容体を阻害する物質」は、中でも、慢性関節

リウマチモデル動物の滑膜内への細胞浸潤を抑制するものが好ましいが、

- 1) 血中の I I 型コラーゲンに対する抗体量、
- 2) 足浮腫、足体積、
- 5 3) 骨、軟骨破壊、
- 4) 足、尾、鼻等の炎症反応、
- 5) 血沈、
- 6) 末梢血中の白血球数増加、
- 7) 臓器重量変化、
- 10 8) フィブリノーゲン、C - r e a c t i v e   p r o t e i n  
(C R P.) 等の血中急性期反応タンパク質、
- 9) D N A に対する抗体等の自己抗体価、
- 10) 生存率、
- 11) 滑膜増生、
- 15 等を改善するものであれば、その種類および由来を問わない。さらに好ましくは、抗 L A R C 受容体中和抗体、抗 C C R 6 抗体が挙げられる。

さらに、本発明で使用する「慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られた L A R C 受容体を阻害する物質」は、L A R C 受容体を介したシグナル伝達を遮断し L A R C 受容体の生物学的活性を抑制する「L A R C 受容体のアンタゴニスト（拮抗物質）」を含む。

さらには、上記の慢性関節リウマチモデル動物を用いて、慢性関節リウマチの治療剤や予防剤のスクリーニングを行うことができる。すなわち、該慢性関節リウマチモデル動物の滑膜内への細胞浸潤の抑制を評価する方法が好ましいが、

- 1) 血中の I I 型コラーゲンに対する抗体量、
- 2) 足浮腫、足体積、
- 3) 骨、軟骨破壊、
- 4) 足、尾、鼻等の炎症反応、
- 5) 血沈、
- 6) 末梢血中の白血球数増加、
- 7) 臓器重量変化、
- 8) フィブリノーゲン、C - r e a c t i v e   p r o t e i n  
(C R P) 等の血中急性期反応タンパク質、
- 9) D N A に対する抗体等の自己抗体価、
- 10) 生存率、
- 11) 滑膜増生、

等の改善を指標にすれば、評価することができる。さらに、好ましくは、該抗 L A R C 抗体の L A R C 阻害作用、もしくは、該抗 L A R C 受容体抗体の L A R C 受容体阻害作用と比較し評価することにより、慢性関節リウマチの治療剤や予防剤のスクリーニングをする方法が挙げられる。該スクリーニング法は、低分子化合物、中和抗体のスクリーニングに使用することが好ましいが、これらに限られたものではない。

後述の実施例 1 および実施例 2 は、i n   v i t r o での慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞が L A R C 発現能力をもつことを示している。

実施例 3 のデータは、慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞の産生した L A R C が、リンパ球の遊走を誘導し、さらに L A R C を阻害する物質である抗 L A R C 抗体がこの遊走を阻害することを示している。

実施例 4 および実施例 5 は、慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞の産生した L A R C が、末梢血単核球の遊走を誘導し、さらに L A R C を阻害する物質である抗 L A R C 抗体および C C R 6 を阻害する物質である抗 C C R 6 抗体がこの遊走を阻害することを示している。すなわち、慢性関節リウマチの滑膜組織への細胞浸潤はケモカインによる細胞の遊走が原因であることから、「L A R C を阻害する物質」および「L A R C 受容体を阻害する物質」により、滑膜への B リンパ球、樹状細胞、メモリー T リンパ球の浸潤が抑制されることが考えられる。

10 さらに、実施例 6、実施例 7、実施例 8 および実施例 9 は、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織における、

(1) L A R C の発現 (図 6 および図 7)、

(2) C C R 6 陽性細胞の局在 (図 8 および図 9)

について検討したものである。

15 その結果、上記 (1) については、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織において、L A R C の発現が見られた。一方、変形性関節症患者の滑膜組織においては、L A R C は検出されなかった。また、(2) については、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織において、C C R 6 陽性細胞の局在が認められた。(1) および (2)

20 の結果は、B リンパ球、樹状細胞、メモリー T リンパ球の浸潤が起っている慢性関節リウマチ患者の滑膜でのみ L A R C の発現が起こり、B リンパ球、樹状細胞、メモリー T リンパ球の浸潤がほとんど観察されない変形性関節症の滑膜では L A R C が発現していないことを示す。

25 実施例 10 および実施例 11 は、慢性関節リウマチの動物モデルであるマウス I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節におけ

る L A R C（実施例 10）、C C R 6（実施例 11）m R N A の  
発現について経時的に調べたものである。これによると、L A R  
C、C C R 6 の発現は、関節炎発症マウスにおいて上昇しており、  
この発現のピークは滑膜への細胞浸潤が激しく起こる時期と一致  
5 していた。関節炎発症マウスの関節滑膜に樹状細胞の浸潤が観察  
されたことから（実施例 12）、慢性関節リウマチの動物モデル  
においても病因が、L A R C および L A R C 受容体による細胞浸  
潤の誘導にあると示唆された。

実施例 13 および実施例 14 は、慢性関節リウマチの動物モデ  
10 ルであるラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの発症関節におけ  
る L A R C m R N A（実施例 13）、C C R 6 と考えられる m  
R N A（実施例 14）の発現について経時的に調べたものである。  
これによると、L A R C、C C R 6 の発現は、関節炎発症ラット  
において上昇していた。ラット C C R 6 は未だ同定されていない  
15 が、様々な検証を行った結果、実施例 14 で解析したものはラッ  
ト C C R 6 m R N A であると言える。

ラット C C R 6 は以下のようにして得ることができる。すなわ  
ち、米国 N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e  
c h n o l o g y I n f o r m a t i o n（N C B I）のデー  
20 タベースに登録されている e x p r e s s e d s e q u e n c  
e t a g（E S T）からラット C C R 6 の E S T を見つけだし、  
この配列を基にして R a p i d A m p l i f i c a t i o n  
o f c D N A E n d s（R A C E 法）を行う。ラット C C R  
6 の E S T は、例えば、N C B I のデータベースの A c c e s s  
25 i o n N o. A I 0 4 5 1 5 5 を挙げるることができる。

実施例 15 は、ラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの膝関節

滑膜におけるL A R Cタンパク質の発現について調べたものである。これによると、滑膜組織に新生された血管内皮細胞上にL A R Cタンパク質の存在が確認された。

すなわち、実施例10～15の結果より、慢性関節リウマチモデル動物においてもその発症にL A R CおよびL A R C受容体が関与していることが示された。さらに、これらのことは慢性関節リウマチモデル動物に「L A R Cを阻害する物質」もしくは「L A R C受容体を阻害する物質」を投与することにより治療効果が得られることを意味している。好ましくは、「L A R Cを阻害する物質」は抗L A R C抗体であり、「L A R C受容体を阻害する物質」は抗C C R 6抗体であるが、これに限られるものではない。

慢性関節リウマチモデル動物への「L A R Cを阻害する物質」もしくは「L A R C受容体を阻害する物質」の投与方法は、M C P - 1のアンタゴニスト、抗R A N T E S抗体、抗I L - 1抗体を慢性関節リウマチ動物モデルに投与することにより慢性関節リウマチの治療効果が示されている例に従えばよい（B a r n e s ら, J . C l i n . I n v e s t . , 1 9 9 8 , 1 0 1 , 2 9 1 0 ; v a n d e L o o ら, A r t h r i t i s . R h e u m . , 1 9 9 5 , 3 8 , 1 6 4 ; G o n g ら, J . E x p . M e d . , 1 9 9 7 , 1 8 6 , 1 3 1）。例えば、投与経路としては、腹腔内、静脈内、関節内が好ましいが、特に限定されない。投与量としては、「L A R Cを阻害する物質」もしくは「L A R C受容体を阻害する物質」の性状、中和能によるため、特に限定はされないが、一匹あたり0.5mgから5mgを満たすものが好ましい。

すなわち、実施例の結果は慢性関節リウマチの原因と考えられ

る B リンパ球、樹状細胞、メモリー T リンパ球の浸潤が、L A R C および L A R C 受容体により誘導されていることを示唆している。さらには、L A R C と L A R C 受容体の介する反応を阻害する事が、新たな慢性関節リウマチの治療法になることが示唆される。

本発明で用いられる L A R C を阻害する物質、L A R C 受容体を阻害する物質、L A R C のアンタゴニスト、または L A R C 受容体のアンタゴニストは、好ましくは製薬学的に許容される担体を配合することによって、本発明の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤として用いることができる。

この場合の製薬学的に許容される担体としては、後記賦形剤と同様のものを挙げる事ができる。この場合の L A R C を阻害する物質、L A R C 受容体を阻害する物質、L A R C のアンタゴニスト、または L A R C 受容体のアンタゴニストと担体との配合量については、後記のように活性成分の投与量に従うが、特に限定されず、広範囲に選択され、通常 L A R C と同じサブグループの C C ケモカインである M C P - 1 の作用を阻害する薬剤は全組成物中 1 ~ 70 重量%、好ましくは 5 ~ 50 重量%である。得られた組成物は、更に公知の方法で適当な賦形剤等を用いて軟カプセル剤、硬カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散財、懸濁剤、液剤、シロップ剤等の経口剤、注射剤、座剤、または外用剤として提供される。

かかる賦形剤としては、植物油（例えばトウモロコシ油、綿実油、ココナッツ油、アーモンド油、落花生油、オリーブ油等）、中鎖脂肪酸グリセライド油等の油状エステル、鉱物油、トリカプリリン、トリアセチン等のグリセリンエステル類、エタノール等

のアルコール類、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、動物油脂、セルロース誘導体（結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン、デキストリン、乳糖、マンニトール、ソルビトール、デンプン等が挙げられる。

活性成分の投与量は、疾患の程度、患者の年齢等にもよるが、一日につき一人あたり 0.01mg ~ 1000mg 程度で、好ましくは一日につき一人あたり 1mg ~ 200mg であり、このような条件を満足するように製剤するのが好ましい。

#### 実施例

以下、実施例に従って本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲をこれらの実施例に限定するものではないことはいうまでもない。

#### 実施例 1

##### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞の樹立および滑膜細胞における L A R C mRNA の発現

##### (1) 滑膜細胞の調製

慢性関節リウマチ患者の関節を外科的に処置する際、滑膜組織を得た。滑膜組織をハサミにより細切後、0.2mg/mL コラゲナーゼ溶液（W o r t h i n g t o n B i o c h e m i c a l C o r p o r a t i o n 製）により 37℃、1 時間処理することで、酵素的に分解し、メッシュを通して単一細胞を得た。単離された細胞を試験管に回収し、10% ウシ胎児血清（J R H B i o s c i e n c e 製）、10mM H E P E S、100

units/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法 minimum essential medium (DMEM) (GIBCO BRL 製) により洗浄した。これらの細胞を上記した培養液に懸濁し、培養ディッシュ内で 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した後、非付着性細胞を除去し滑膜細胞を得た。この滑膜細胞を、五継代から八継代培養したものを下記の実験に使用した。

(2) 滑膜細胞における LARC mRNA の発現

上記で得られた滑膜細胞を上記した培養液を用いて数日間培養した。培養ディッシュの全面をほぼ被う程度に細胞が増殖したのを確認した後、培養液に 1 ng/mL のリコンビナントヒトインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Cambridge 製) もしくは 1 ng/mL のリコンビナントヒト腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) (Cambridge 製) を添加し、1 時間刺激した。

滑膜細胞における LARC の発現量の変化を RT-PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法によって調べた。すなわち滑膜細胞から総 RNA を ISOGEN (ニッポンジーン製) を用いて抽出し、cDNA Synthesis Kit (Takara 製) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。PCR は、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5  $\mu$ M、2.5 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Takara 製)、5  $\mu$ L の cDNA、0.2 mM のデオキシヌクレオチドミックス、1.5 mM の MgCl<sub>2</sub> を含む総量 25  $\mu$ L の反応液より行った。

用いたプライマーは、LARC, 5' - TTGGATCCTGCTGCTACTCCACCTCTG - 3', 5' - TTCT

CGAGTATATTTCACCCAAGTCTGTTTT-  
3'; beta 2-microglobulin ( $\beta 2m$ ),  
5'-TTC TGG CCT GGAGGGCATCC-3',  
5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'である。

5 条件としては、1) 変性 (95℃で1分間)、2) アニール  
グ (52℃で30秒間)、3) 伸長反応 (72℃で30秒間) の  
サイクルをLARC遺伝子の増幅のために30サイクル、 $\beta 2m$   
遺伝子は25サイクル行った。PCR産物の一部を0.5  $\mu g$  /  
mLのエチジウムブロミド (Sigma製) を含む2% アガロ  
10 ースゲル (ニッポンジーン製) を用いて電気泳動した。泳動像は、  
DIG-High Prime DNA Labeling a  
nd Detection Kit (Roche Diagnos  
tics GmbH製) を用いたサザンハイブリダイゼーショ  
ン法により検出した。

15 使用したプローブは、LARC, 5'-GATGTCACAG  
GCCTTCATTGG-3'; beta 2-microg  
lobulin ( $\beta 2m$ ), 5'-ACACGGCAGGCA  
TACTCATC-3'である。

図1は、滑膜細胞におけるLARCメッセンジャーRNA (m  
20 RNA) の発現をRT-PCR法およびサザンハイブリダイゼー  
ション法により調べた結果である。これによると、滑膜細胞をI  
L-1 $\beta$ もしくはTNF- $\alpha$ で1時間刺激することにより、LA  
RC mRNAの発現が見られた。これに対して、未刺激の滑膜  
細胞においては、LARC mRNAの発現は観察されなかった。  
25 内部標準である $\beta 2m$  mRNAの発現量は、全てのサンプル間  
で変わらないことから、これらの結果は、滑膜細胞がIL-1 $\beta$ 、

TNF- $\alpha$ の刺激に依存して、LARC mRNAを発現することを示している。

## 実施例 2

### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞におけるLARCタンパク質

#### 5 の発現

- 慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞 (CELL APPLICATIONS 製) を 4 穴チャンバースライド (岩城硝子製) 内で実施例 1 と同様に、10% ウシ胎児血清 (GIBCO BRL 製)、10mM HEPES、100units/mL ペニシリン、100 $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む DMEM (GIBCO BRL 製) 培養液中で 24 時間培養した。その後、この培養液に 10ng/mL の IL-1 $\beta$  (R&D Systems 製) および 10ng/mL の TNF- $\alpha$  (R&D Systems 製) の両方を添加し、24 時間刺激した。
- 15 培養終了後、培養液を捨てチャンバー部をはがし、ウェルに PBS (0.1M) を加え、穏やかに洗浄した。この細胞を 4% のパラホルムアルデヒドを含む PBS により室温で 10 分間固定した。PBS により室温で 3 回洗浄後、0.2% の Triton X-100 (Sigma 製) を含む PBS により 5 分間処理した。
- 20 た。PBS により 5 回洗浄後、ドライヤーで風乾し、インキュベーターで完全に乾燥させた。以下に示す操作は全て室温で行った。乾燥後、過酸化水素により内因性のペルオキシダーゼを除去し、PBS により 2 回洗浄後、1% のスキムミルク (和光純薬製) を含む PBS で一晩ブロックを行った。スライドガラスを PBS
- 25 により 2 回洗浄した後、ヤギ IgG 抗ヒト LARC ポリクローナル抗体 (2 $\mu$ g/mL) (R&D Systems 製) を滴

下し、1時間放置した。PBSにより3回洗浄後、ビオチン化したウサギ抗ヤギIgGポリクローナル抗体 ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (DAKO製) を加え、1時間放置した。スライドガラスをPBSにより3回洗浄し、ペルオキシダーゼーストレプトアビジン  
5 (DAKO製) を加えた後、1時間放置し、再びPBSで3回洗浄を行った。最後に、ジアミノベンジジン(DAKO製)を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

図2は、滑膜細胞におけるLARCタンパク質の発現を免疫染色法により調べた結果である。これによると、IL-1 $\beta$ および  
10 TNF- $\alpha$ により刺激された滑膜細胞は、LARCタンパク質を発現していた(図2a、2b)。これに対して、図2eで示したように、ビオチン化したウサギ抗ヤギIgGポリクローナル抗体だけでは、陽性細胞が検出されなかった。また、未刺激の滑膜細胞は、LARCタンパク質を発現していなかった(図2c、2d)。  
15 したがって、これらのことは、IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ により刺激された滑膜細胞が、LARCのmRNAだけでなくタンパク質も発現することを示している。

### 実施例3

抗LARC中和抗体によるリンパ球の遊走阻害(慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞が産生するLARCに対するリンパ球の遊走能の測定)  
20

実施例2で用いた滑膜細胞を0.5%ウシ胎児血清(GIBCO BRL製)を含むDMEM(GIBCO BRL製)培養液中で24時間培養した。その後、この培養液を血清を含まないDMEMに交換し、 $10\text{ng}/\text{mL}$ のIL-1 $\beta$ (R&D Systems製)、 $10\text{ng}/\text{mL}$ のTNF- $\alpha$ (R&D Systems製)  
25

e m s 製) の両方を添加後、24 時間刺激した。培養終了後、培養上清を回収し、リンパ球の遊走能の測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

遊走能の測定に用いたリンパ球は、健常人よりヘパリン入り真空採血管を用いて採取した末梢血 50 mL より調製した。すなわち、以下に示す方法により行った。採血した血液に対し等量の P B S を加え混和し、これを F i c o l l - P a q u e ( P h a r m a c i a 製) の入った試験管に静かに重層した。1500 r p m、 $20^{\circ}\text{C}$ で30分遠心した後、単核球の層を回収した。得られた単核球から C D 1 4 陽性単球を除去するために、抗 C D 1 4 抗体が結合した磁気ビーズ ( D Y N A L 製) を加えた。 $4^{\circ}\text{C}$ で1時間処理した後、専用の磁石を用いて磁石に結合しなかった細胞を回収し、リンパ球とした。このリンパ球を 0.1 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) を含む D M E M に  $5 \times 10^6$  個 / mL の濃度で懸濁後、蛍光試薬である 10 mM 5 ( a n d 6 ) - c a r b o x y f l u o r e s c e i n d i a c e t a t e s u c c i n i m i d y l e s t e r ( C F S E ) (和光純薬製) を 1 / 1000 量添加し、室温で20分間処理した。

リンパ球の遊走能の測定は、ポアサイズ  $5 \mu\text{M}$ 、ポリビニールピロリドンフリータイプのフィルターを装着した 96 穴マイクロプレート ( N e u r o P r o b e 製) を用いた。まず、プレートに C F S E 標識した  $5 \times 10^6$  個 / mL のリンパ球をスタンダードとして  $20 \mu\text{L}$  / ウェルずつ加えた。同時に、被験溶液として、1) 上記の培養上清、2) 培養上清をウサギ I g G 抗ヒト L A R C ポリクローナル抗体 (  $30 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) ( P e p r o T e c h 製) により室温で30分間処理したもの、3) 培養上

清をウサギ IgG コントロール抗体 ( $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (DAKO 製) により室温で 30 分間処理したものを、それぞれ  $30 \mu\text{L}$  / ウェルずつプレートに加えた。フィルターを装着後、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 15 分放置した。フィルター上のスタン  
5 ダード以外のウェルに CFSE 標識した  $5 \times 10^6$  個/ $\text{mL}$  のリンパ球を添加し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 3 時間放置した。フィルター上の細胞を除去後、フィルターを外し、Cyt of flour 2000 (Millipore 製) を用いてマイクロプレートのウェルごとの蛍光強度を測定した。

10 リンパ球の遊走能は、以下の数式を用いて算出した。

遊走能 (%) = (被験溶液を添加したウェル内に検出された蛍光強度 / スタンダードとして細胞を添加したウェル内に検出された蛍光強度)  $\times 100$

図 3 は、滑膜細胞が産生する LARC に対するリンパ球の遊走  
15 能を調べた結果である。これによると、24 時間 IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  で刺激した滑膜細胞の培養上清に対して、34.

8% のリンパ球が遊走活性を示した。これに対して、同じ培養上清を LARC を阻害する物質である  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$  のウサギ IgG 抗ヒト LARC ポリクローナル抗体により処理した場合、2

20 9.7% のリンパ球が遊走活性を示した。これは、未処理の培養上清と比較して、リンパ球の遊走が 5.1% 減少していることを示す。ウサギ IgG コントロール抗体により培養上清を処理した場合、未処理の培養上清と同程度の 34.9% のリンパ球の遊走が起こることから、これらの結果は、ウサギ IgG 抗ヒト LARC  
25 C ポリクローナル抗体が培養上清内の LARC を中和することにより、リンパ球の遊走能を低下させていることを示している。す

なわち、滑膜細胞によって産生されたL A R Cが、リンパ球の遊走を誘導することが示された。また、L A R Cを阻害する物質が、L A R Cに対する細胞遊走を阻害することが示された。

#### 実施例 4

- 5 抗L A R C中和抗体による末梢血単核球の遊走阻害（慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞が産生するL A R Cに対する末梢血単核球の遊走能の測定）

実施例 2 で用いた滑膜細胞を0.5%ウシ胎児血清を含むD M E M培養液中で24時間培養した。その後、この培養液を血清を  
10 含まないD M E Mに交換し、10 ng/mLのI L - 1  $\beta$ 、10 ng/mLのT N F -  $\alpha$ の両方を添加後、24時間刺激した。培養終了後、培養上清を回収し、末梢血単核球の遊走能の測定まで-80℃で保存した。

遊走能の測定に用いた末梢血単核球は、健常人よりヘパリン入り  
15 り真空採血管を用いて採取した末梢血50 mLより調製した。すなわち、以下に示す方法により行った。採血した血液に対し等量のP B Sを加え混和し、これをF i c o l l - P a q u e (P h a r m a c i a 製)の入った試験管に静かに重層した。1500 r.p.m、20℃で30分遠心した後、単核球の層を回収した。こ  
20 の単核球を0.1%ウシ血清アルブミン(B S A)を含むD M E Mに $5 \times 10^6$ 個/mLの濃度で懸濁後、蛍光試薬である10 m M 5 (a n d 6) - c a r b o x y f l u o r e s c e i n d i a c e t a t e s u c c i n i m i d y l e s t e r (C F S E) (和光純薬製)を1/1000量添加し、室温で2  
25 0分間処理した。

単核球の遊走能の測定は、ポアサイズ5  $\mu$  M、ポリビニルピロ

リドンフリータイプのフィルターを装着した96穴マイクロプレート（Neuro Probe製）を用いた。まず、プレートにCFSE標識した $5 \times 10^6$ 個/mLの末梢血単核球をスタンダードとして20  $\mu$ L/ウェルずつ加えた。同時に、被験溶液として、1）上記の培養上清、2）培養上清をウサギIgG抗ヒトLARCPポリクローナル抗体（30  $\mu$ g/mL）により室温で30分間処理したもの、3）培養上清をウサギIgGコントロール抗体（30  $\mu$ g/mL）（DAKO製）により室温で30分間処理したものを、それぞれ30  $\mu$ L/ウェルずつプレートに加えた。

10 フィルターを装着後、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で15分放置した。フィルター上のスタンダード以外のウェルにCFSE標識した $5 \times 10^6$ 個/mLの末梢血単核球を添加し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で4時間放置した。フィルター上の細胞を除去後、フィルターを外し、Cytofluor 2000（Millipore製）を用いてマイクロプレートのウェルごとの蛍光強度を測定した。

15

末梢血単核球の遊走能は、以下の数式を用いて算出した。

遊走能（%）＝（被験溶液を添加したウェル内に検出された蛍光強度／スタンダードとして細胞を添加したウェル内に検出された

20 蛍光強度） $\times 100$

図4は、滑膜細胞が産生するLARCPに対する単核球の遊走能を調べた結果である。これによると、24時間IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ により刺激された滑膜細胞の培養上清に対して、18.9%の単核球が遊走活性を示した。これに対して、同じ培養上清をLARCPを阻害する物質である30  $\mu$ g/mLのウサギIgG

25 抗ヒトLARCPポリクローナル抗体により処理した場合、15.

9 %の単核球が遊走活性を示した。これは、未処理の培養上清と比較して、単核球の遊走が3.0 %減少していることを示す。ウサギIgGコントロール抗体により培養上清を処理した場合、未処理の培養上清と同程度の18.2 %の単核球の遊走が起こることから、これらの結果は、ウサギIgG抗ヒトLARCPリクローナル抗体が培養上清内のLARCPを中和することにより、単核球の遊走能を低下させていることを示している。すなわち、滑膜細胞によって産生されたLARCPが、単核球の遊走を誘導することが示された。また、LARCPを阻害する物質が、滑膜細胞培養上清に対する細胞遊走を阻害することが示された。

#### 実施例 5

#### 抗CCR6抗体による末梢血単核球の遊走阻害（慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞が産生するLARCPに対する末梢血単核球の遊走能の測定）

15 実施例2で用いた滑膜細胞を0.5 %ウシ胎児血清を含むDMEM培養液中で24時間培養した。その後、この培養液を血清を含まないDMEMに交換し、10 ng/mLのIL-1 $\beta$ 、10 ng/mLのTNF- $\alpha$ の両方を添加後、24時間刺激した。培養終了後、培養上清を回収し、末梢血単核球の遊走能の測定まで  
20 -80℃で保存した。

測定に用いた末梢血単核球は、健常人よりヘパリン入り真空採血管を用いて採取した末梢血50 mLより調製した。すなわち、以下に示す方法により行った。採血した血液に対し等量のPBSを加え混和し、これをFicoll-Paque（Pharmacia製）の入った試験管に静かに重層した。1500 rpm、  
25 20℃で30分遠心した後、単核球の層を回収した。この単核球

を 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む DMEM に  $5 \times 10^6$  個/mL の濃度で懸濁後、蛍光試薬である 10 mM 5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (和光純薬製) を 1/1000 量添加し、室温で 20 分間処理した。

単核球の遊走能の測定は、ポアサイズ  $5 \mu\text{M}$ 、ポリビニールピロリドンフリータイプのフィルターを装着した 96 穴マイクロプレート (Neuro Probe 製) を用いた。まず、プレートに CFSE 標識した  $5 \times 10^6$  個/mL の末梢血単核球をスタンダードとして  $20 \mu\text{L}$ /ウェルずつ加えた。同時に、被験溶液として、上記の培養上清を  $30 \mu\text{L}$ /ウェルずつプレートに加えた。フィルターを装着後、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 15 分放置した。フィルター上のスタンダード以外のウェルの一部に CFSE 標識した  $5 \times 10^6$  個/mL の末梢血単核球を  $20 \mu\text{L}$  ずつ添加した。同時に、これらの細胞の一部をマウス IgG2b 抗ヒトCCR6 モノクローナル抗体 ( $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (R&D Systems 製) により氷上で 30 分間処理したもの、もしくはマウス IgG2b コントロール抗体 ( $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Pharmingen 製) により氷上で 30 分間処理したものを、それぞれ  $20 \mu\text{L}$  ずつ残りのウェルに加えた。5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 4 時間放置後、フィルター上の細胞を除去した。この後、フィルターを外し、Cytofluor 2000 (Millipore 製) を用いてマイクロプレートのウェルごとの蛍光強度を測定した。

末梢血単核球の遊走能は、以下の数式を用いて算出した。

遊走能 (%) = (被験溶液を添加したウェル内に検出された蛍光強度 / スタンドとして細胞を添加したウェル内に検出された蛍光強度) × 100

- 図5は、滑膜細胞が産生するLAR Cに対する単核球の遊走能を調べた結果である。これによると、24時間IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ により刺激された滑膜細胞の培養上清に対して、18.0%の単核球が遊走活性を示した。これに対して、単核球をCCR6を阻害する物質である30  $\mu$ g/mLのマウスIgG2b抗ヒトCCR6モノクローナル抗体により処理した場合、13.0%の単核球が遊走活性を示した。これは、未処理の単核球と比較して、遊走が5.0%減少していることを示す。マウスIgG2bコントロール抗体により単核球を処理した場合、未処理の単核球と同じ18.0%の遊走が起こることから、これらの結果は、抗CCR6抗体が単核球表面のCCR6を阻害することにより、単核球の遊走能を低下させていることを示している。すなわち、CCR6を阻害する物質が、滑膜細胞培養上清に対する細胞遊走を阻害することが示された。

#### 実施例6

#### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜組織におけるLAR Cタンパク質の発現

- 慢性関節リウマチ患者および変形性関節症患者の関節を外科的に処置する際、滑膜組織を得た。滑膜組織をハサミにより細切し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBSにより4℃で18時間固定後、10%サッカロースで24時間処理した。滑膜組織はOCTコンパウンドに包埋後、冷却したアセトン中で凍結し、クリオスタットにより5  $\mu$ mの厚さで薄切した。

以下に示す操作は全て室温で行った。薄切した切片を3%の過酸化水素水を含むメタノールにより20分間処理した後、0.

3%のウシ血清アルブミン(BSA)(Vector Laboratories, Inc製)を含むPBSで20分間ブロックを行った。さらに5%ヤギ血清を含むPBSで30分間ブロックを行った後、切片にウサギIgG抗ヒトLARCPポリクローナル抗体( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ )(Peprro Tech製)を滴下し、1時間放置した。一次抗体のコントロールとしては、ウサギIgG精製抗体を用いた。PBSにより3回洗浄後、ビオチン化したヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ )(Vector Laboratories, Inc製)を滴下し、30分間放置した。PBSにより3回洗浄し、ペルオキシダーゼ・ストレプトアビジン(Vector Laboratories, Inc製)を加えた後、1時間放置し、再びPBSで3回洗浄を行った。最後に、ジアミノベンジジン(DAKO製)を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。図6は、滑膜組織におけるLARCPタンパク質の発現を免疫染色法により調べた結果である。これによると、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織は、LARCPタンパク質を発現していた(図6A)。これに対して、図6Bに示したように、変形性関節症患者由来の滑膜組織において、LARCPタンパク質は検出されなかった。したがって、これらのことは、樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球の激しい浸潤が観察される慢性関節リウマチ患者の滑膜組織でのみLARCPが発現し、これらの細胞の浸潤がごくわずかな変形性関節症患者の滑膜組織では、LARCPが発現していないことを示している。すなわち、慢性関節リウマチ患者の滑

膜組織への樹状細胞、Bリンパ球、メモリーTリンパ球の浸潤に、LARCが関与していることが示唆された。

#### 実施例 7

#### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜組織におけるLARC mRNA

##### 5 の発現

In situ hybridization法は、Ganらによって示された方法に従って行った（Ganら, Epithelial Cell Biol., 1992, 1, 13）。すなわち、実施例6で得られた慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織切片をproteinase K (10  $\mu$ g/mL) (Worthington Biochemical Corporation製)により処理し、hybridization solution (Novagen製)中でジゴキシゲニン (DIG) 標識したセンスおよびアンチセンスリボプローブと反応させた  
10 (50℃、18時間)。切片をRNase (20  $\mu$ g/mL)により処理した後、0.75 U/mL アルカリフォスファターゼ標識した抗DIG抗体（ベーリンガー・マンハイム製）と反応させた（室温、60分間）。最後に、4-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4  
15 -chloro-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) 溶液（Roshe Diagnostics GmbH製）を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

該センスおよびアンチセンスリボプローブは実施例1で用いた  
25 LARCのプライマーを使用し、遺伝子工学実験ノート上巻および下巻（田村隆明編集，羊土社）に示された方法に従って作成し

た。

図 7 は、滑膜組織における L A R C m R N A の発現を I n  
s i t u h y b r i d i z a t i o n 法により調べた結果であ  
る。これによると、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織におい  
5 て、L A R C のアンチセンスリボプローブによりシグナルが検出  
された（図 7）。すなわちこの結果は、慢性関節リウマチ患者由  
来の滑膜組織において、L A R C m R N A が発現していること  
を意味している。これに対して、L A R C のセンスリボプローブ  
を用いた場合、L A R C m R N A は検出されなかった。したが  
10 って、これらのことは、樹状細胞、B リンパ球、メモリー T リン  
パ球の激しい浸潤が観察される慢性関節リウマチ患者の滑膜組織  
でのみ L A R C m R N A が発現していることを示している。す  
なわち、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織への樹状細胞、B リン  
パ球、メモリー T リンパ球の浸潤に、L A R C が関与しているこ  
15 とが示唆された。

#### 実施例 8

#### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜組織における C C R 6 陽性細胞の 検出

実施例 6 で得られた慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織切片  
20 を 3 % の過酸化水素水を含むメタノールにより 2 0 分間処理した  
後、0 . 3 % のウシ血清アルブミン（B S A）（V e c t o r  
L a b o r a t o r i e s , I n c 製）を含む P B S で 2 0 分間  
ブロックを行った。さらに 5 % ヤギ血清を含む P B S で 3 0 分間  
ブロックを行った後、切片に一次抗体としてマウス I g G 2 b  
25 抗ヒト C C R 6 モノクローナル抗体（1 0  $\mu$  g / m L）（R & D  
S y s t e m s 製）を滴下し、1 時間放置した。一次抗体のコン

コントロールとしては、マウス I g G 2 b コントロール抗体 ( 1 0  $\mu$  g / m L ) ( P h a r m i n g e n 製 ) を用いた。P B S により 3 回洗浄後、ビオチン化したヤギ抗マウス I g G ポリクローナル抗体 ( 2  $\mu$  g / m L ) ( D A K O 製 ) を滴下し、3 0 分間放置した。

5 P B S により 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼストレプトアビジン ( V e c t o r L a b o r a t o r i e s , I n c 製 ) を加えた後、1 時間放置し、再び P B S で 3 回洗浄を行った。最後に、ジアミノベンジジン ( D A K O 製 ) を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

10 図 8 は、滑膜組織における C C R 6 タンパク質の発現を免疫染色法により調べた結果である。これによると、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織は、C C R 6 タンパク質を発現していた ( 図 8 ) 。これに対して、抗ヒト C C R 6 抗体の代わりにマウス I g G 2 b コントロール抗体により処理したサンプルは、C C R 6 陽性細胞が検出されなかった。したがって、これらのことは、慢性  
15 関節リウマチ患者の滑膜組織において、C C R 6 陽性細胞が浸潤していることを示している。すなわち、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織への L A R C の作用による細胞浸潤は、L A R C の受容体が関与していることが示唆された。

## 20 実施例 9

### 慢性関節リウマチ患者由来滑膜組織における C C R 6 m R N A の発現

I n s i t u h y b r i d i z a t i o n 法は、G a n らによって示された方法に従って行った ( G a n ら, E p i t h e l i a l . C e l l . B i o l . , 1 9 9 2 , 1 , 1 3 ) 。す  
25 なわち、実施例 6 で得られた慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組

組織切片を *proteinase K* ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (*Worthington Biochemical Corporation* 製) により処理し、*hybridization solution* (*Novagen* 製) 中でジゴキシゲニン (*DIG*) 標識したセンスおよびアンチセンスリボプローブと反応させた (50℃、18時間)。切片を *RNase* ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) により処理した後、 $0.75 \text{ U}/\text{mL}$  アルカリフォスファターゼ標識した抗 *DIG* 抗体 (ベーリンガー・マンハイム 製) と反応させた (室温、60分間)。最後に、*4-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphate* (*NBT/BCIP*) 溶液 (*Roshe Diagnostics GmbH* 製) を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

該センスおよびアンチセンスリボプローブは *CCR6* のプライマーである 5'-TGGAATCCGTGGGGCTGTCA GTCATCAT-3', 5'-TTCTCGAGCTGCCCCAATAAAGCGTAGA-3' を使用し、遺伝子工学実験ノート上巻および下巻 (田村隆明編集, 羊土社) に示された方法に従って作成した。

図9は、滑膜組織における *CCR6 mRNA* の発現を *In situ hybridization* 法により調べた結果である。これによると、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織において、*CCR6* のアンチセンスリボプローブによりシグナルが検出された (図9)。すなわちこの結果は、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜組織において、*CCR6 mRNA* が発現していること

を意味している。これに対して、CCR6のセンスリポプローブを用いた場合、CCR6 mRNAは検出されなかった。したがって、これらのことは、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織において、CCR6陽性細胞が浸潤していることを示している。すなわち、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織へのLAR Cの作用による細胞浸潤は、LAR Cの受容体が関与していることが示唆された。

#### 実施例 10

マウス II 型コラーゲン関節炎モデル (マウス Collagen induced arthritis, CIA) の誘導および関節炎発症腫関節におけるLAR C mRNAの発現

##### (1) マウス II 型コラーゲン関節炎モデルの誘導

関節炎惹起物質は、以下のように調製した。すなわち、ウシ関節由来 II 型コラーゲン (CII) 溶液 (コラーゲン技術研修会製) を等量のフロイント完全アジュバント (Difco製) と混合し、均一なエマルジョンとした。

関節炎の誘導は、以下のように実施した。すなわち、7週齢のDBA/1系雄性マウスの尾根部皮内に上記のエマルジョンを100  $\mu$ L (CII 150  $\mu$ g) を免疫した。3週後、同組成のエマルジョンを同量追加免疫した。

##### (2) マウス関節炎発症腫関節におけるLAR C mRNAの発現

関節炎発症関節におけるLAR C mRNAの発現量の経時的変化はリアルタイムPCR法によって調べた。すなわちCIIで免疫したマウスを初回免疫後から1週毎に9週目まで経時的に屠殺し、皮膚を剥離したマウス関節炎発症腫関節から総RNAをISOGEN (ニッポンジーン製) を用いて抽出後、Omni s c

ri p t R T K i t ( Q i a g e n 製) を用いた逆転写反応により c D N A を合成した。P C R は、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.1  $\mu$  M、10  $\mu$  L の 2  $\times$  S Y B R G r e e n P C R M a s t e r M i x ( P E A p p l i e d B i o s y s t e m s 製)、5  $\mu$  L の c D N A を含む総量 20  $\mu$  L の反応液により行った。

用いたプライマーは、L A R C, 5' - A A T C T G T G T G C G C T G A T C C A - 3', 5' - G G T T C A C A G C C C T T T T C A C C - 3' である。また、g l y c e r a l d e h y d e - 3 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e ( G A P D H ) プライマーは P E A p p l i e d B i o s y s t e m s 社から購入した ( T a q M a n R o d e n t G A P D H C o n t r o l R e a g e n t s ) 。

P C R 反応は、1) 変性 ( 9 5  $^{\circ}$  C で 1 5 秒間)、2) アニール  
ン g および伸長反応 ( 6 0  $^{\circ}$  C で 1 分間) の条件で 4 0 サイクルまで行った。各標的遺伝子の発現量の定量は、G e n e A m p 5 7 0 0 S D S s o f t w a r e ( P E A p p l i e d B i o s y s t e m s 製) により行った。すなわち、増幅された P C R 産物 ( 二本鎖 D N A ) に結合した S Y B R G r e e n の蛍  
光シグナル強度を P C R サイクル毎に経時的に測定し、サイクル  
数に対する P C R 産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意  
の閾値 ( 通常、増幅曲線の指数増幅領域の中点付近を選択する)  
の交わる T h r e s h o l d c y c l e ( C t ) 値を算出することにより行った。

内部標準である G A P D H に対する L A R C m R N A の相対的な発現量は、計算式  $2^{-(L A R C \text{ の } C t - G A P D H \text{ の } C t)}$  より算出し

た。

図 10 は、関節炎発症関節における L A R C m R N A の発現量の経時的変化をリアルタイム P C R 法により調べた結果である。これによると、L A R C の発現レベルは初回免疫後 21 から 28 5 日目で上昇し（発現のピークは 28 日目）、その後 42 日目まで急速に減少した。42 日目を過ぎると、この減少は緩やかになり 63 日目には正常マウスのレベルに戻った。C I I 免疫マウスの多くは、28 日目周辺で発症し、この時期にリンパ球が最も滑膜へ浸潤していると考えられることから、L A R C m R N A の発現パターンは関節炎の症状（特に滑膜内リンパ球浸潤の状況）と 10 一致していることが示唆された。

#### 実施例 11

##### マウス関節炎発症踵関節における C C R 6 m R N A の発現

関節炎発症関節における C C R 6 m R N A の発現量の経時的変化はリアルタイム P C R 法によって調べた。実施例 10 と同様に、C I I で免疫したマウスを初回免疫後から 1 週毎に 9 週目まで経時的に屠殺し、皮膚を剥離したマウス関節炎発症踵関節から総 R N A を I S O G E N（ニッポンジーン製）を用いて抽出後、O m n i s c r i p t R T K i t（Q i a g e n 製）を用いた逆転写反応により c D N A を合成した。P C R は、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.1  $\mu$  M、10  $\mu$  L の 2  $\times$  S Y B R G r e e n P C R M a s t e r M i x（P E A p p l i e d B i o s y s t e m s 製）、5  $\mu$  L の c D N A を含む総量 20  $\mu$  L の反応液により行った。 25

用いたプライマーは、C C R 6, 5' - G G C A C A T A T

G C G G T C A A C T T T - 3' , 5' - T G A T A C A G G C  
C A G G A G C A G C - 3' である。また、glyceral d  
e h y d e - 3 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a  
s e ( G A P D H ) プライマーは P E A p p l i e d B i o  
5 s y s t e m s 社から購入した ( T a q M a n R o d e n t  
G A P D H C o n t r o l R e a g e n t s ) 。

P C R 反応は、1) 変性 ( 9 5 ° C で 1 5 秒間 ) 、 2) アニーリ  
ングおよび伸長反応 ( 6 0 ° C で 1 分間 ) の条件で 4 0 サイクルま  
で行った。各標的遺伝子の発現量の定量は、Gene Amp . 5  
10 7 0 0 S D S s o f t w a r e ( P E A p p l i e d B  
i o s y s t e m s 製 ) により行った。すなわち、増幅された P  
C R 産物 ( 二本鎖 D N A ) に結合した S Y B R G r e e n の蛍  
光シグナル強度を P C R サイクル毎に経時的に測定し、サイクル  
数に対する P C R 産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意  
15 の閾値 ( 通常、増幅曲線の指数増幅領域の midpoint 付近を選択する )  
の交わる T h r e s h o l d c y c l e ( C t ) 値を算出する  
ことにより行った。

内部標準である G A P D H に対する C C R 6 m R N A の相対  
的な発現量は、計算式  $2^{-(CCR6のCt - GAPDHのCt)}$  より算出し  
20 た。

図 1 1 は、関節炎発症関節における C C R 6 m R N A の発現  
量の経時的変化をリアルタイム P C R 法により調べた結果である。  
これによると、C C R 6 の発現レベルは初回免疫後 2 1 から 2 8  
日目で上昇し ( 発現のピークは 2 8 日目 ) 、その後 3 5 日目まで  
25 急速に減少した。3 5 日目を過ぎると、この減少は緩やかになり  
6 3 日目には正常マウスのレベルに戻った。C C R 6 m R N A

の発現の経時的変化は、実施例 10 で示した L A R C m R N A の発現パターンとほぼ一致していた。すなわち、これらのことは C C R 6 発現細胞が L A R C の作用により関節炎発症マウスの関節に浸潤していることを示唆している。

## 5 実施例 12

### マウス関節炎発症踵関節滑膜に浸潤した樹状細胞の検出

実施例 10 に示した方法により関節炎を誘導したマウス（初回免疫後 3 週目）の踵関節を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドで固定後、10 % エチレンジアミン四酢酸（E D T A）により  
10 脱灰を行った。この踵関節をパラフィンに包埋後、5  $\mu$  m の厚さで薄切した。

上記の組織切片を用いた免疫染色は以下に示すとおり行った。すなわち、薄切した切片の脱パラフィン操作を行い、3 % の過酸化水素水を含むメタノールにより 20 分間処理した後、0.3 %  
15 のウシ血清アルブミン（B S A）（V e c t o r L a b o r a t o r i e s , I n c 製）を含む P B S で 20 分間ブロックを行った。切片にラット I g G 2 a 抗マウス樹状細胞抗体である M I D C - 8 抗体（原液より十倍希釈）（S e r o t e c 製）を滴下し、1 時間放置した。P B S により 3 回洗浄後、ビオチン化したウサ  
20 ギ抗ラット I g ポリクローナル抗体（原液より五百倍希釈）（D A K O 製）を滴下し、30 分間放置した。P B S により 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼーストレプトアビジン（V e c t o r L a b o r a t o r i e s , I n c 製）を加えた後、1 時間放置し、再び P B S で 3 回洗浄を行った。最後に、ジアミノベンジ  
25 ジン（D A K O 製）を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

図 1 2 は、関節炎を発症したマウスの滑膜組織における樹状細胞の浸潤を免疫染色法により調べた結果である。これによると、滑膜組織において樹状細胞の存在が確認された（図 1 2）。すなわち、これらのことは、関節炎を発症したマウスの滑膜組織に樹状細胞が浸潤していることを示している。

### 実施例 1 3

ラット I I 型コラーゲン関節炎モデル（ラット Collagen induced arthritis, CIA）の誘導および関節炎発症腫関節における L A R C mRNA の発現

#### 10 （1）ラット I I 型コラーゲン関節炎モデルの誘導

関節炎惹起物質は、以下のように調製した。すなわち、ウシ関節由来 I I 型コラーゲン（C I I）溶液（コラーゲン技術研修会製）をフロイント不完全アジュバント（Chemicon 製）、N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine（MDP）（Chemicon 製）と混合し、均一なエマルジョンとした。

関節炎の誘導は、以下のように実施した。すなわち、6 週齢の Lewis 系雌性ラットの背部皮内に上記のエマルジョンを 1 0 0 0  $\mu$  L（C I I 8 0 0  $\mu$  g）を免疫した。1 週後、同組成のエマルジョンを 1 0 0  $\mu$  L（C I I 8 0  $\mu$  g）追加免疫した。

#### 20 （2）ラット関節炎発症腫関節における L A R C mRNA の発現

関節炎発症関節における L A R C mRNA の発現量の経時的変化は R T - P C R 法によって調べた。すなわち C I I で免疫したラットを初回免疫後から 1 週毎に 3 週目まで経時的に屠殺し

（正常ラットは 2 匹ずつ、I I 型コラーゲン免疫ラットは 3 匹ずつ

つ)、皮膚を剥離したラット関節炎発症腫関節から総RNAをISOGEN(ニッポンジーン製)を用いて抽出後、OmniScript RT Kit(Qiagen製)を用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。PCRは、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ0.5  $\mu$ M、  
5 5  $\mu$ LのHotStarTaq PCR Master Mix Kit(Qiagen製)、2  $\mu$ LのcDNAを含む総量10  $\mu$ Lの反応液により行った。

用いたプライマーは、LARC, 5'-CCAGTCAGAA  
10 AGCAGCAAGCA-3', 5'-CCATCCCAGAA  
AAGCATCCG-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',  
5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'である。  
15 る。

条件としては、1)変性(94℃で20秒間)、2)アニーリング(60℃で30秒間)、3)伸長反応(72℃で30秒間)のサイクルをLARC遺伝子の増幅のために34サイクル、GAPDH遺伝子は28サイクル行った。PCR産物の一部を0.5  
20  $\mu$ g/mLのエチジウムブロミド(Sigma製)を含む2%アガロースゲル(ニッポンジーン製)を用いて電気泳動し、Gel Doc 2000(Bio-Rad製)により泳動像を検出した。

図13は、関節炎ラットの腫関節におけるLARC mRNA  
25 の発現の経時変化について解析したものである。これによると、関節炎発症ラットにおいて、LARC mRNAの強い発現が観

察された。この発現は、発症が起こり始める初回免疫後から2週目の段階に、ピークに達した。一方、正常ラットにおいて、L A R C m R N A の発現は見られなかった。また、初回免疫後3週目で発症しなかったラット（図13、個体番号21番）は、L A R C の発現が見られるが、かなり弱いものであった。すなわち、以上の結果は、慢性関節リウマチモデル動物における関節炎の発症にL A R C が関与していることを示している。

#### 実施例14

##### ラット関節炎発症踵関節におけるC C R 6 m R N A の発現

10 関節炎発症関節におけるC C R 6 m R N A の発現量の経時的変化はR T - P C R 法によって調べた。すなわち実施例13と同様にC I I で免疫したラットを初回免疫後から1週毎に3週目まで経時的に屠殺し（正常ラットは2匹ずつ、I I 型コラーゲン免疫ラットは3匹ずつ）、皮膚を剥離したラット関節炎発症踵関節  
15 から総R N A をI S O G E N（ニッポンジーン製）を用いて抽出後、O m n i s c r i p t R T K i t（Q i a g e n 製）を用いた逆転写反応によりc D N A を合成した。P C R は、各標的遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ0.5  $\mu$  M、5  $\mu$  L のH o t S t a r T a q P C R M a s t e r M i x K i t（Q i a g e n 製）、2  $\mu$  L のc D N A を含む総量10  $\mu$  L の反応液より行った。

用いたプライマーは、C C R 6, 5' - G C T T T G T G C T C T C G T G T T A C - 3', 5' - G G A T G T G T G G T G T A T G A G G A - 3'; g l y c e r a l d e h y d e - 3 - p h o s p h a t e d e h y d r o g e n a s e (G A P D H), 5' - A C C A C A G T C C A T G C C A T C A C - 3',  
25

5' - T C C A C C A C C C T G T T G C T G T A - 3' である。

条件としては、1) 変性 (94℃で20秒間)、2) アニール  
ング (60℃で30秒間)、3) 伸長反応 (72℃で30秒間)  
5 のサイクルをLARC遺伝子の増幅のために34サイクル、GAPDH  
遺伝子は28サイクル行った。PCR産物の一部を0.5  
μg/mLのエチジウムブロミド (Sigma製) を含む2%  
アガロースゲル (ニッポンジーン製) を用いて電気泳動し、Gel  
Doc 2000 (Bio-Rad製) により泳動像を検出  
10 した。

図14は、ラット発症関節におけるCCR6と考えられる mRNA  
の発現の経時変化について解析したものである。これによ  
ると、関節炎発症ラットにおいて、CCR6と考えられる mRNA  
の強い発現が観察された。一方、正常ラットにおいて、CCR  
15 R6と考えられる mRNAの発現はかなり弱いのもであった。  
すなわち、以上の結果は、慢性関節リウマチモデル動物における  
関節炎の発症にLARC受容体が関与していることを示している。

#### 実施例 15

##### ラット関節炎発症膝関節滑膜におけるLARCタンパク質の発現

20 実施例13に示した方法により関節炎を誘導したラットの膝関  
節を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、10% エチ  
レンジアミン四酢酸 (EDTA) により脱灰を行った。この腫関  
節をパラフィンに包埋後、5 μmの厚さで薄切した。

上記の組織切片を用いた免疫染色は以下に示すとおり行った。  
25 すなわち、薄切した切片の脱パラフィン操作を行い、3%の過酸  
化水素水を含むメタノールにより20分間処理した後、0.3%

のウシ血清アルブミン (BSA) (Vector Laboratories, Inc 製) を含む PBS で 20 分間ブロックを行った。切片にヤギ IgG 抗ラット/マウス LARC ポリクローナル抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (R&D Systems 製) を滴下し、  
5 1 時間放置した。一次抗体のコントロールとしては、ヤギ IgG コントロール抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (DAKO 製) を用いた。PBS により 3 回洗浄後、ビオチン化したウサギ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体 ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (DAKO 製) を滴下し、30 分間放置した。PBS により 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼース  
10 トレプトアビジン (Vector Laboratories, Inc 製) を加えた後、1 時間放置し、再び PBS で 3 回洗浄を行った。最後に、ジアミノベンジジン (DAKO 製) を加え、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。

図 15 は、関節炎を発症したラットおよび正常ラットの滑膜組織における LARC タンパク質の発現を免疫染色法により調べた結果である。これによると、関節炎を発症したラットの滑膜組織に新生された血管内皮細胞上に LARC タンパク質の存在が確認された (図 15 a)。これに対して、図 15 b に示したように、正常ラットの滑膜組織には、陽性細胞が検出されなかった。すな  
20 わち、これらのことから、関節炎を発症したラットの滑膜組織において LARC は mRNA だけでなく、タンパク質も発現していることが示された。一般的に、組織に浸潤する細胞は、血管内皮細胞上のケモカインを認識することが必要であることから、これらの結果は、LARC タンパク質が滑膜への細胞浸潤に重要な働き  
25 きをしていることを示している。

以上より、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞は LARC を

產生し、リンパ球および末梢血単核球の細胞遊走を誘導したことが示された。さらに、この細胞遊走は、L A R Cを阻害する物質およびL A R C受容体を阻害する物質により阻害された。また、慢性関節リウマチ患者および慢性関節リウマチモデル動物の滑膜

5 組織においてL A R Cが発現し、L A R C受容体発現細胞が滑膜組織に浸潤していることが示された。

したがって、L A R CとL A R C受容体の介する反応の阻害が、新たな慢性関節リウマチの治療法になることが示唆される。

## 請 求 の 範 囲

1. L A R C を阻害する物質を有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
- 5 2. 該 L A R C を阻害する物質が L A R C のアンタゴニストである請求の範囲第 1 項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
3. 該 L A R C を阻害する物質が抗 L A R C 抗体である請求の範囲第 1 項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
- 10 4. 該 L A R C を阻害する物質が、慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られたことを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれか一項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
5. L A R C 受容体を阻害する物質を有効成分とする慢性関節
- 15 リウマチの治療剤もしくは予防剤。
6. 該 L A R C 受容体を阻害する物質が L A R C 受容体のアンタゴニストである請求の範囲第 5 項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
7. 該 L A R C 受容体を阻害する物質が抗 L A R C 受容体抗体
- 20 である請求の範囲第 5 項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。
8. 該 L A R C 受容体を阻害する物質が、慢性関節リウマチモデル動物を用いて評価することにより得られたことを特徴とする請求の範囲第 5 項～第 7 項のいずれか一項に記載の慢性関節リウ
- 25 マチの治療剤もしくは予防剤。
9. 該 L A R C 受容体が C C R 6 である請求の範囲第 5 項～第

7 項のいずれか一項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。

10. 請求の範囲第 1 項～第 3 項、および第 5 項～第 7 項のいずれか一項に記載の慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤を、  
5 慢性関節リウマチモデル動物を用いてスクリーニングする方法。

11. 抗 L A R C 抗体の L A R C 阻害作用と比較し評価する工程を含む、慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤のスクリーニング方法。

12. 抗 L A R C 受容体抗体の L A R C 受容体阻害作用と比較し  
10 評価する工程を含む、慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤のスクリーニング方法。

13. 該抗 L A R C 受容体抗体が抗 C C R 6 抗体であり、該 L A R C 受容体阻害作用が C C R 6 阻害作用である、請求の範囲第 1 2 項に記載のスクリーニング方法。

15 14. L A R C により誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価する工程を含む、慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤のスクリーニング方法。

15. 慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞の培養上清により誘導された細胞遊走に対する阻害能を評価する工程を含む、慢性関節  
20 リウマチの治療剤もしくは予防剤のスクリーニング方法。

16. 請求の範囲第 1 1 項～第 1 5 項のいずれか一項に記載のスクリーニング方法によって得られた物質を有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。

17. L A R C ポリペプチドを一部変異させた物質を有効成分  
25 とする慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。

18. L A R C 遺伝子を遺伝子工学的に改変し得られた物質を

有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤もしくは予防剤。

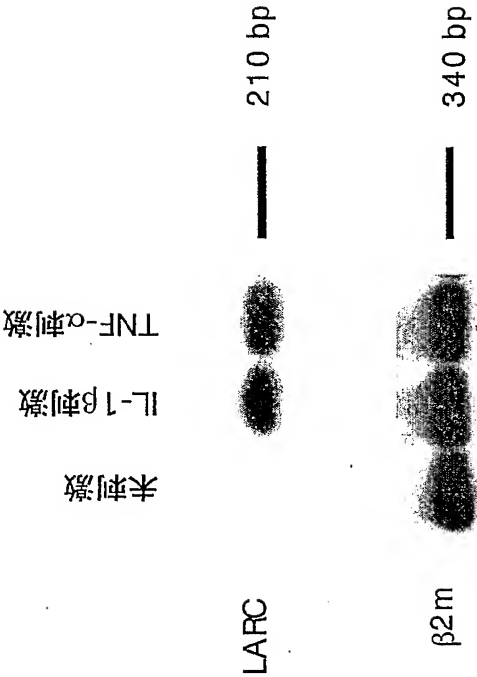
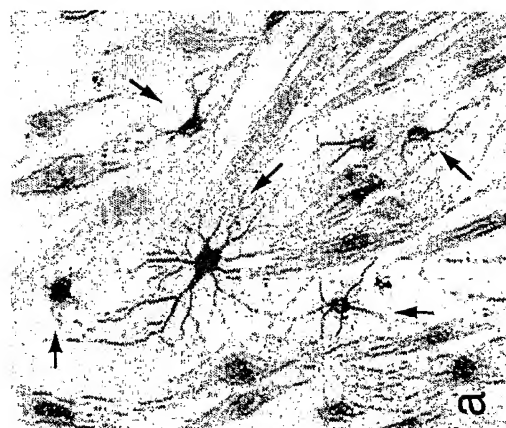
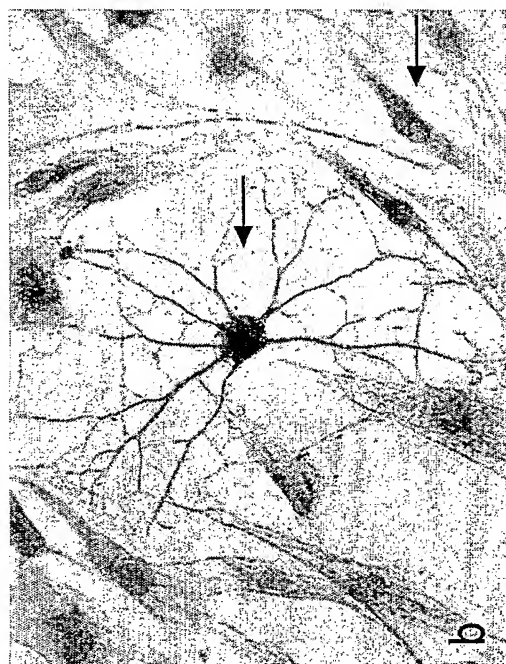
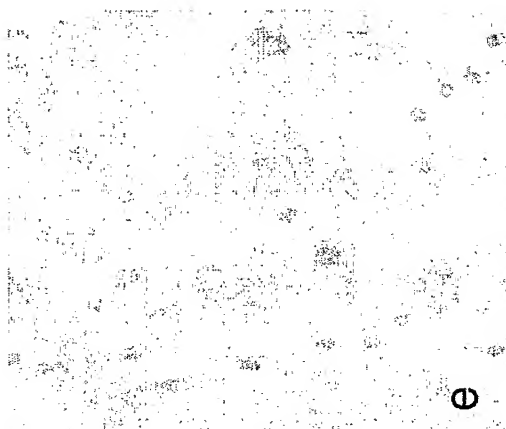


図 1

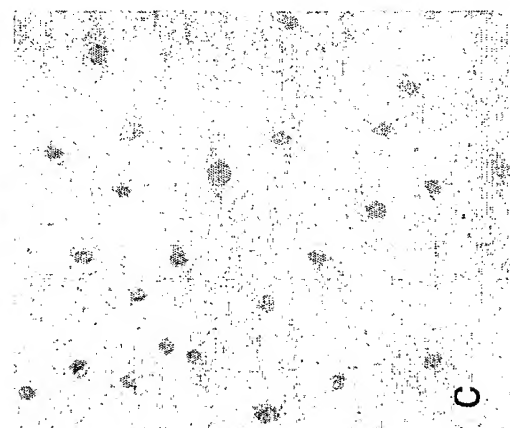
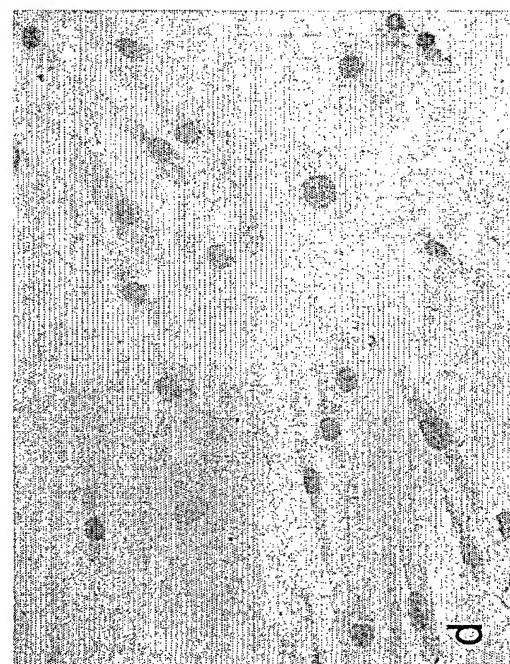
図 2

抗ヤギIgG抗体 (図e)

ヤギIgG抗LARC抗体/ 抗ヤギIgG抗体 (図a-d)



IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  刺激 24時間 (図a、b、e)



未刺激 24時間 (図c、d)

矢印 (←) LARC陽性細胞

図3

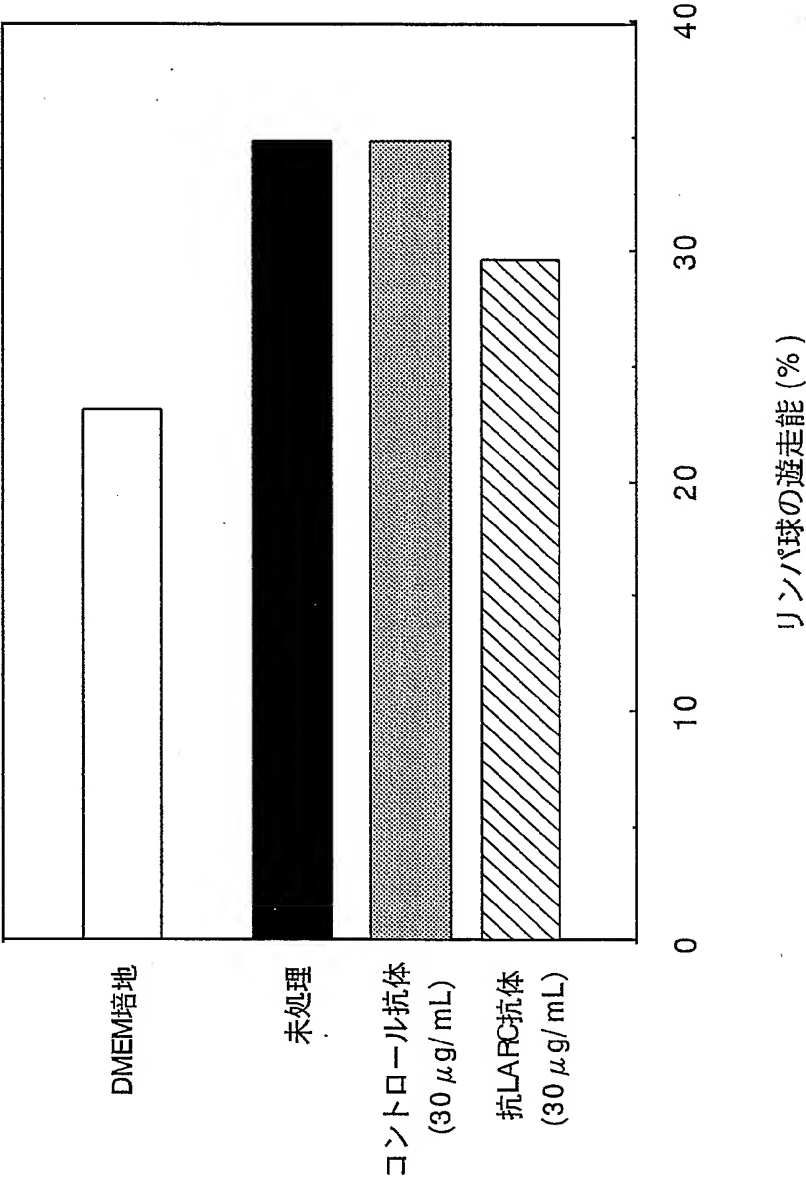


図4

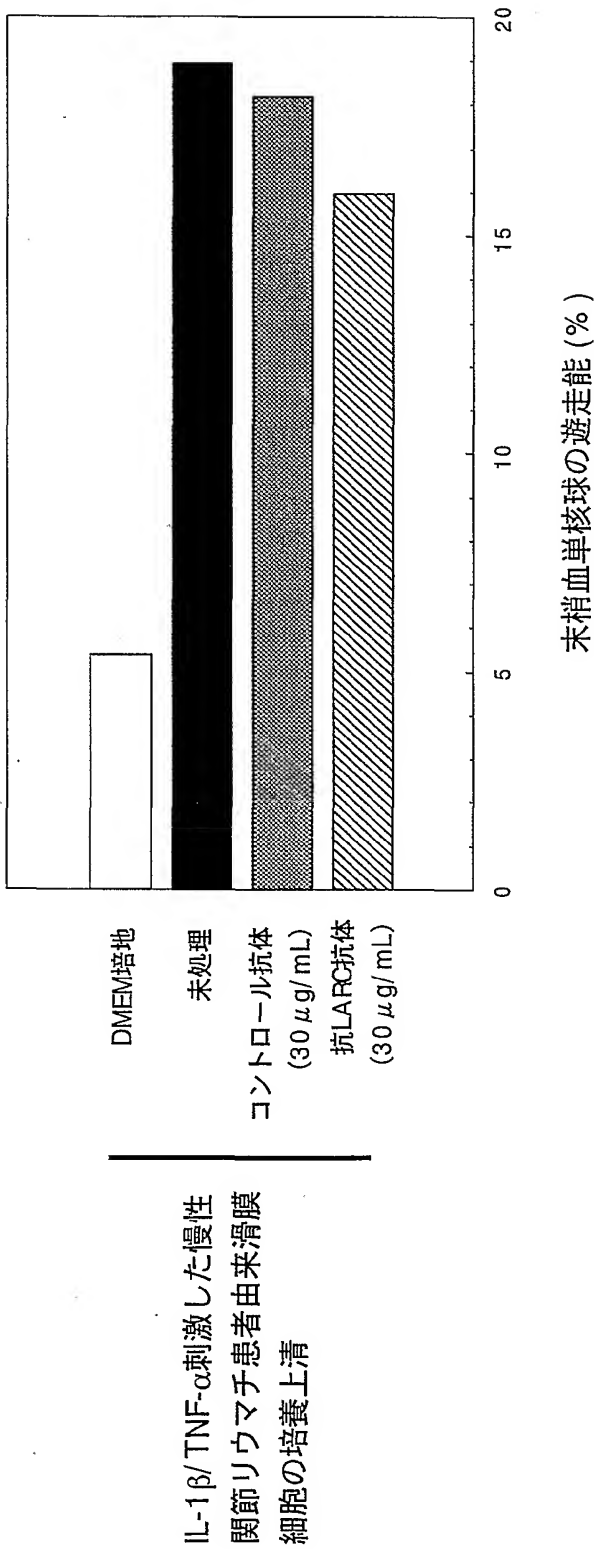


図5

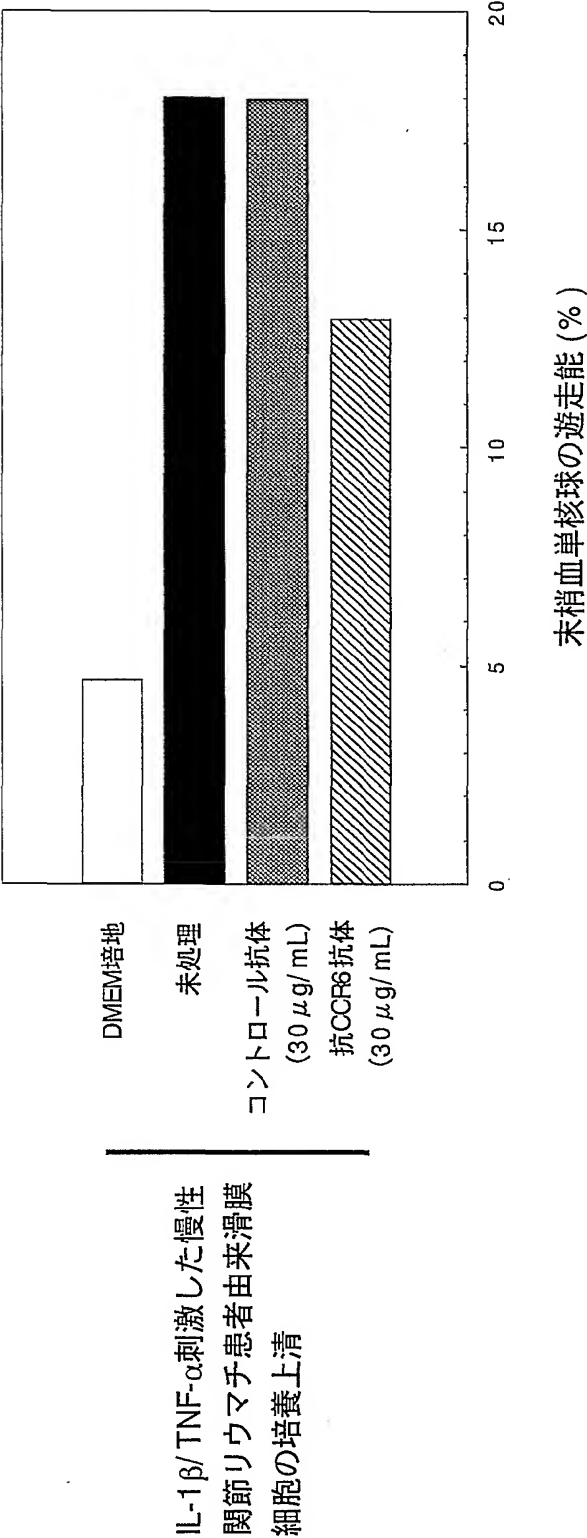
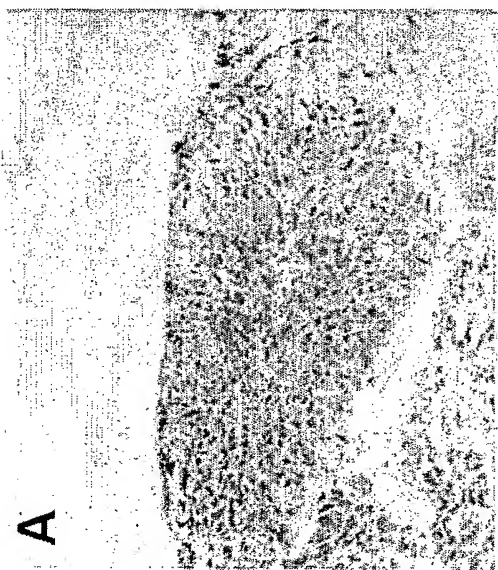


図6

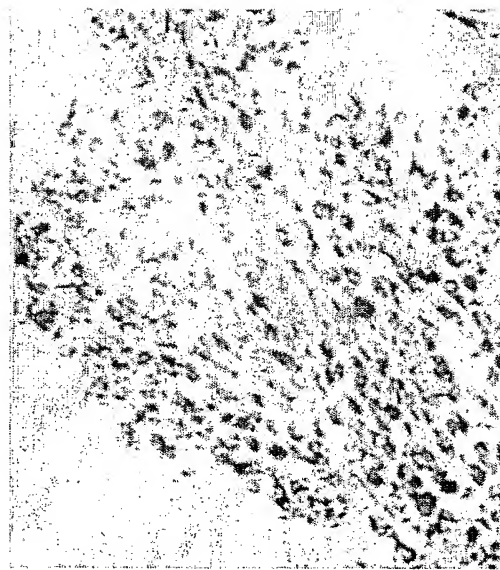


慢性関節リウマチ患者の滑膜組織



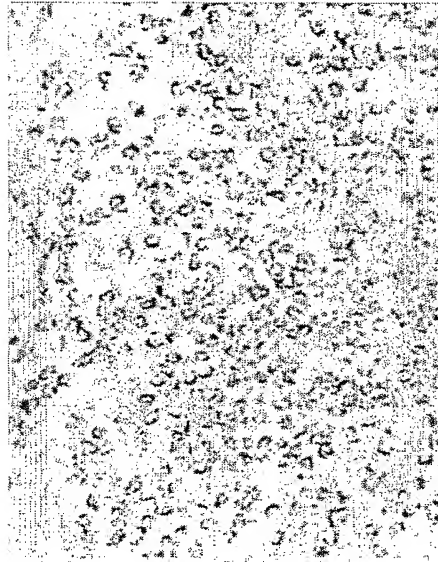
変形性関節症患者の滑膜組織

図7

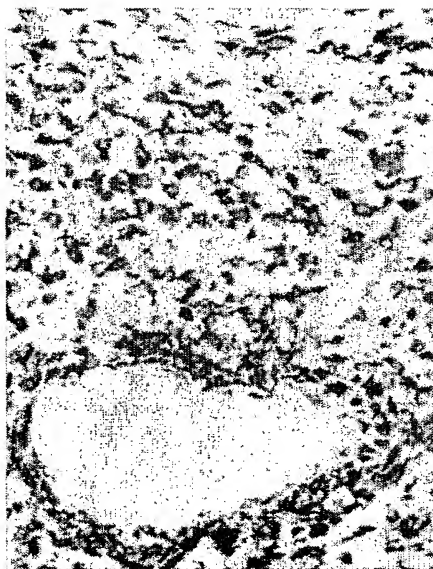


慢性関節リウマチ患者の滑膜組織

図8

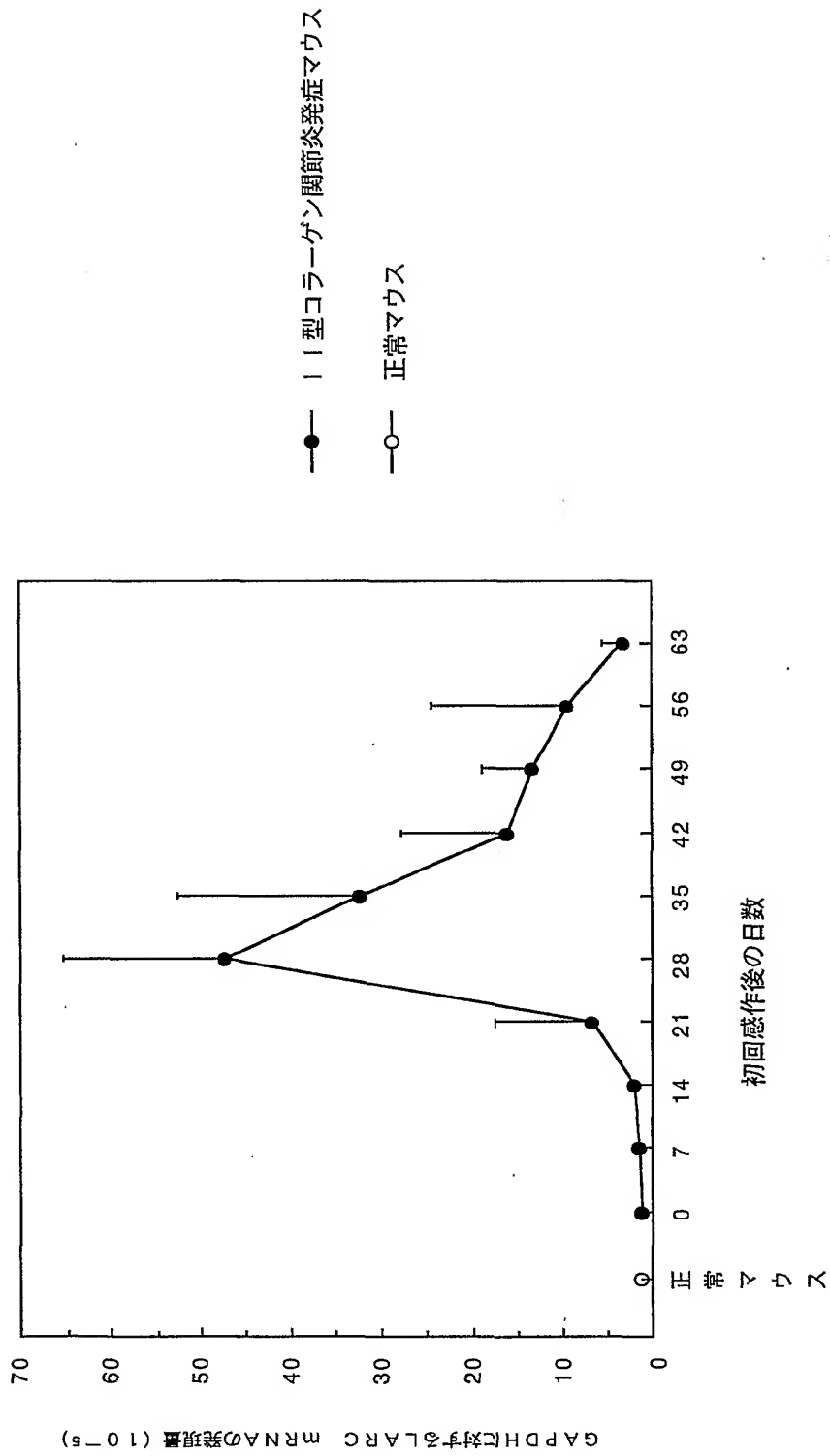


慢性関節リウマチ患者の滑膜組織



慢性関節リウマチ患者の滑膜組織

図10



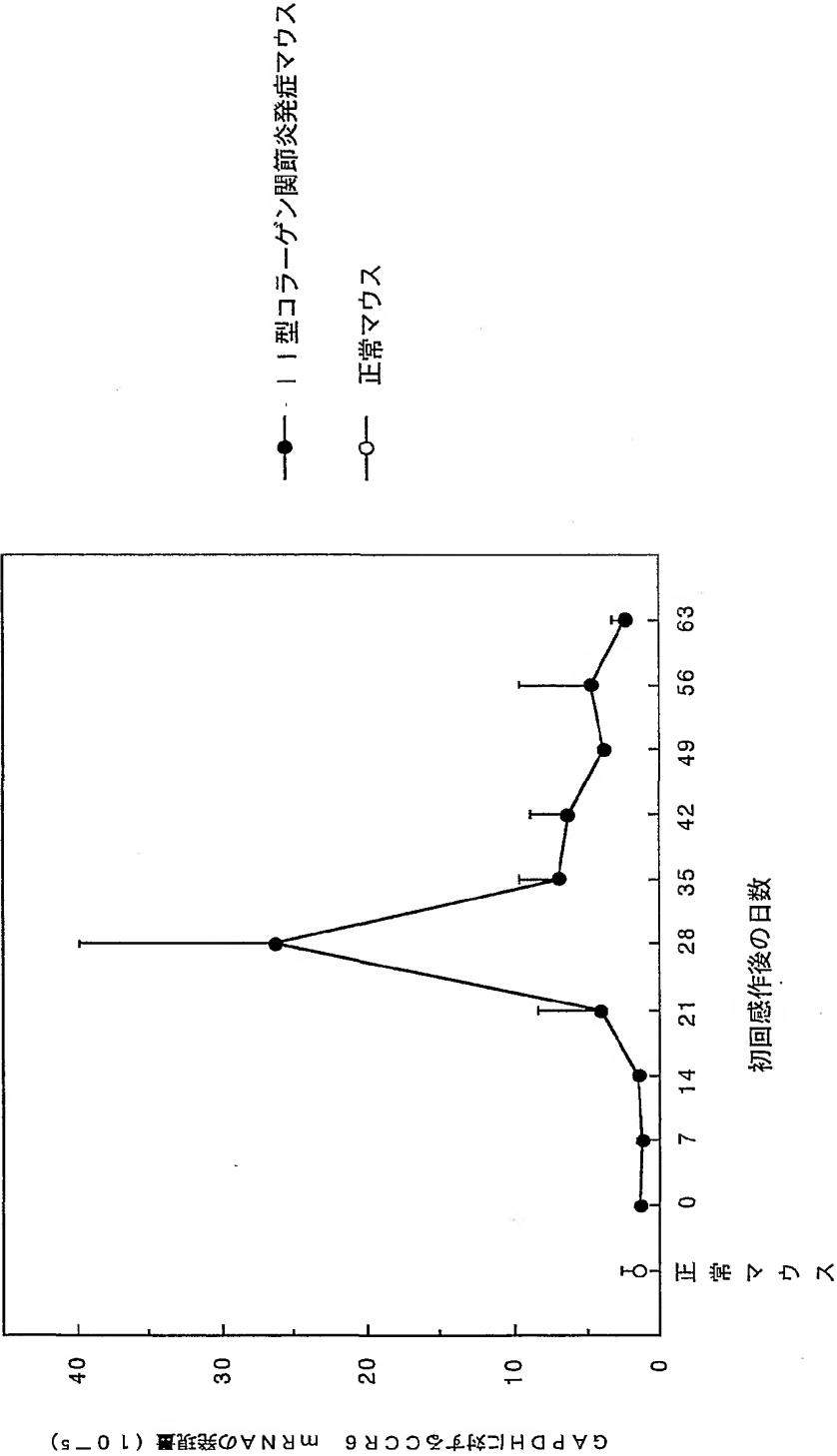
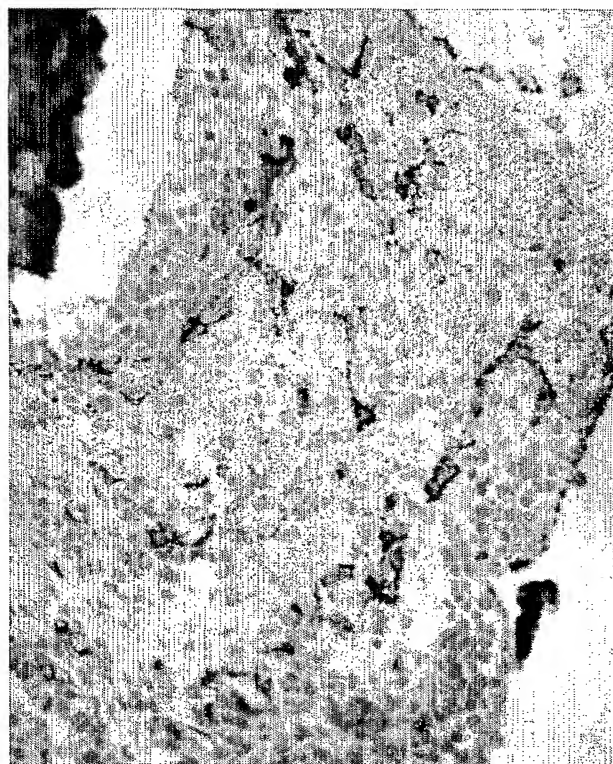
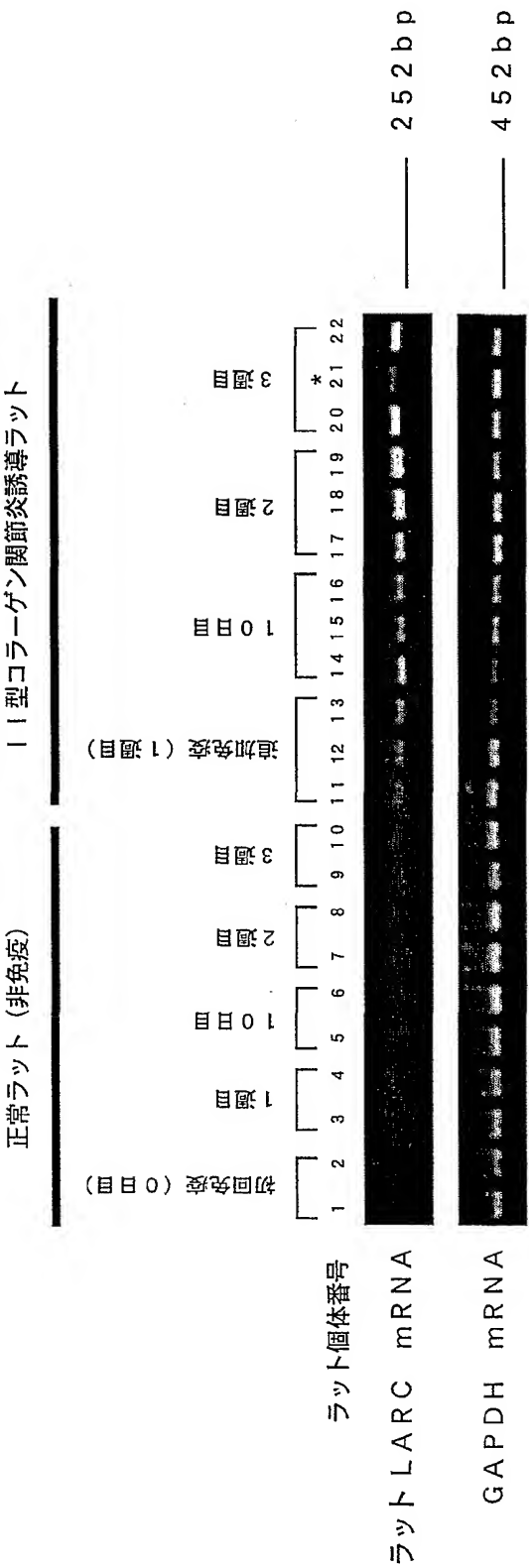


図11



ⅠⅠ型コラーゲン関節炎発症マウスの滑膜組織

図13



\* 個体番号21は関節炎未発症。

図14

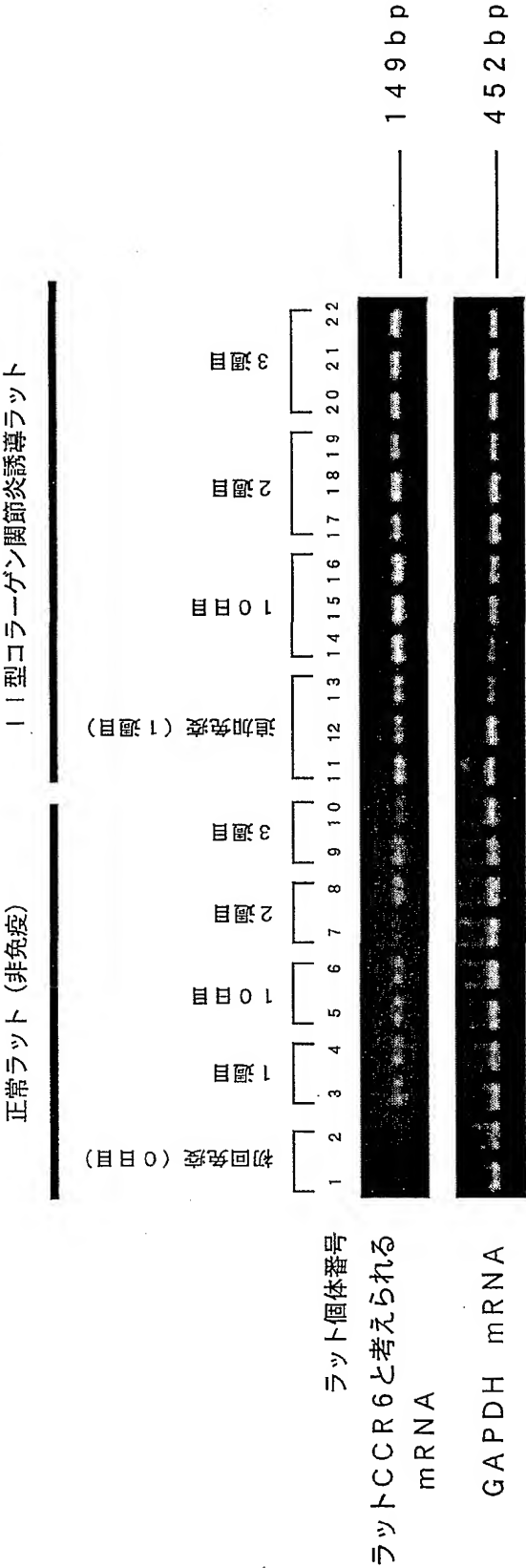


図15



Ⅰ型コラーゲン関節炎発症ラットの滑膜組織

矢印 (←) LAR陽性細胞



正常ラットの滑膜組織

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03504

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, 38/17, 31/711, 48/00, A61P29/00, 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 39/395, 38/17, 31/711, 48/00, A61P29/00, 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1940-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 98/17800 A (Shionogi & Co., Ltd.), Full text; especially, abstract; page 5, lines 8 to 20; experimentation examples 1, 3 (Family: none)	1-8, 16-18 9-15
Y	Kunio HIESHIM, "Mijuku Jujou Saibou ya Soshiki Shikou-sei Lympha no Yuusou wo Seigyo suru Chemokine LARC to Juyou-tai CCR6", Saibou Kougaku, Vol.19, No.5, (2000), pages 708 to 716; Full text; especially, table 1; page 710, right column, 9 <sup>th</sup> line from the bottom to the 3 <sup>rd</sup> line from the bottom	9, 13
Y	WO 95/32285 A2 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale), 30 November, 1995 (30.11.95) & EP 759985 A & US 5675060 A & JP 10-504701 A	10-15
PX	WO 01/17558 A2 (Schering Corporation), 15 March, 2001 (15.03.01), (Family: none)	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search  
 22 June, 2001 (22.06.01)

 Date of mailing of the international search report  
 03 July, 2001 (03.07.01)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03504

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1,2,4-6,8,9,16,  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03504

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

These claims relate to remedies/preventives for rheumatoid arthritis which contain as the active ingredient compounds defined by desired properties such as "substance inhibiting LARC", "LARC receptor antagonist", etc. Although these claims involve any compounds having such properties, it is recognized that only a part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning of Article 6 of the PCT or disclosed in the meaning of Article 5 of the PCT.

Since these claims are neither supported nor disclosed by the description, any meaningful search can be hardly practiced on the whole claim 1.

Even though the common general knowledge at the application is taken into consideration, the scope of "substance inhibiting LARC", "LARC receptor antagonist", etc. cannot be specified. Accordingly, these claims fail to satisfy the requirement of clearness under Article 6 of the PCT, which makes it difficult to practice any meaningful search on these claims as a whole.

Such being the case, the search has been made mainly on the relationship between LARC and rheumatoid arthritis, and remedies/preventives containing as the active ingredient the compounds as set forth in claims 3, 7, 17 and 18.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. C17 A61K45/00, 39/395, 38/17, 31/711, 48/00, A61P29/00, 19/02			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. C17 A61K45/00, 39/395, 38/17, 31/711, 48/00, A61P29/00, 19/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1940-1992年 日本国公開実用新案公報 1971-1992年 日本国登録実用新案公報 1994-1996年 日本国実用新案登録公報 1996-2001年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
CAPLUS (STN)、BIOSIS (STN)、MEDLINE (STN)、EMBASE (STN)、JICST (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	W0, 98/17800, A(塩野義製薬株式会社)30.4月.1998(30.04.98)全文、特に【要約】、P.5第8~20行、試験例1、試験例3 (ファミリーなし)	1-8, 16-18 9-15	
Y	稗島州雄 (ひえしま くにお) 「未熟樹状細胞や組織指向性リンパ球の遊走を制御するケモカインLARCと受容体CCR6」細胞工学、Vo.19, No.5 (2000年) P.708-716、全文、特に表1、P.710 右欄下から9行目~下から3行目	9, 13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 22.06.01		国際調査報告の発送日 03.07.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 95/32285, A2 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 30. November. 1995 (30. 11. 95) & EP, 759985, A & US, 5675060, A & JP, 10-504701, A	10-15
P X	WO, 01/17558, A2 (Schering Corporation) 15. March. 2001 (15. 03. 01) (No Family)	1-18

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1, 2, 4-6, 8, 9, 16, \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
  
理由については最終頁に記載。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## (第 I 欄 2. の続き)

これらの請求の範囲は、「LARCを阻害する物質」、「LARC受容体アンタゴニスト」など、所望の性質により定義された化合物を有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤・予防剤に関するものである。そして、これらの請求の範囲は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた成分のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

したがって、これらの請求の範囲は、明細書による裏付けを欠き、開示も欠いているから、請求の範囲1全体に関する有意義な調査をすることは、困難である。

また、「LARCを阻害する物質」、「LARC受容体アンタゴニスト」など、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、これらの請求の範囲は、PCT6条における明確性の要件も欠いており、これらの請求の範囲全体に関する有意義な調査をすることは、困難である。

よって、これらの請求の範囲の調査は、LARCと慢性関節リウマチとの関係、及び、請求の範囲3、7、17、18に記載されている化合物を有効成分とする慢性関節リウマチの治療剤・予防剤を中心に行った。